

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/002842

International filing date: 16 February 2005 (16.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-232961
Filing date: 10 August 2004 (10.08.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

16.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 8月10日
Date of Application:

出願番号 特願2004-232961
Application Number:

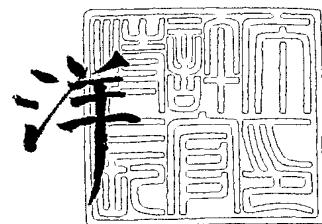
[ST. 10/C] : [JP2004-232961]

出願人 山中伸弥
Applicant(s):
住友製薬株式会社

2005年 3月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 133279
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 01/02
C12N 05/06
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府大阪市天王寺区堂ヶ芝 2-9-7-1401
【氏名】 山中 伸弥
【特許出願人】
【識別番号】 501219312
【氏名又は名称】 山中 伸弥
【特許出願人】
【識別番号】 000183370
【氏名又は名称】 住友製薬株式会社
【代理人】
【識別番号】 100121588
【弁理士】
【氏名又は名称】 五十部 穂
【電話番号】 06-6466-5214
【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2004- 42337
【出願日】 平成16年 2月19日
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 056546
【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0205876

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

以下の（a）および（b）の工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法：

（a）ECA T遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項2】

ECA T遺伝子が、ECA T1遺伝子、ECA T2遺伝子、ECA T3遺伝子、ECA T4遺伝子、ECA T5遺伝子、ECA T6遺伝子、ECA T7遺伝子、ECA T8遺伝子、ECA T9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項1記載のスクリーニング方法。

【請求項3】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項1または2記載のスクリーニング方法。

【請求項4】

体細胞が、ECA T遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞である、請求項1～3いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項5】

体細胞が、ECA T遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、請求項4記載のスクリーニング方法。

【請求項6】

ECA T遺伝子がECA T1遺伝子、ECA T2遺伝子、ECA T3遺伝子、ECA T4遺伝子、ECA T5遺伝子、ECA T6遺伝子、ECA T7遺伝子、ECA T8遺伝子、ECA T9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項4または5記載のスクリーニング方法。

【請求項7】

以下の（a）および（b）の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

（a）ECA T2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項8】

以下の（a）および（b）の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

（a）ECA T3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項9】

以下の（a）および（b）の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

（a）ECA T5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項10】

以下の（a）および（b）の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

（a）ECA T2遺伝子およびECA T3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項11】

E C A T 2 遺伝子と E C A T 3 遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、請求項10記載のスクリーニング方法。

【請求項12】

体細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、請求項7～11いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項13】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項14】

体細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する体細胞である、請求項13記載のスクリーニング方法。

【請求項15】

請求項1～14いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される核初期化物質。

【請求項16】

E S 細胞由来の遺伝子またはタンパク質である、請求項15記載の核初期化物質。

【請求項17】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、請求項1～14いずれか記載のスクリーニング方法において用いる体細胞の供給源としての使用。

【請求項18】

ノックインマウスが、E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、請求項17記載の使用。

【請求項19】

E C A T 遺伝子がE C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子およびO c t 3 / 4 遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項17または18記載の使用。

【請求項20】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項17～19いずれか記載の使用。

【請求項21】

E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞。

【請求項22】

E C A T 遺伝子がE C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子およびO c t 3 / 4 遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項21記載の体細胞。

【請求項23】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項21または22記載の体細胞。

【請求項24】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、請求項 2 1～2 3 いずれか記載の体細胞。

【請求項 2 5】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、請求項 2 4 記載の体細胞。

【請求項 2 6】

以下の (a) および (b) の工程を含む、E S 様細胞の選択方法：

(a) E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 2 7】

E C A T 遺伝子が、E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子およびOct 3/4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 2 6 記載の選択方法。

【請求項 2 8】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 2 6 または 2 7 記載の選択方法。

【請求項 2 9】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 2 6 記載の選択方法：

(a) E C A T 2 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 3 0】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 2 6 記載の選択方法：

(a) E C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 3 1】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 2 6 記載の選択方法：

(a) E C A T 5 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 3 2】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 2 6 記載の選択方法：

(a) E C A T 2 遺伝子およびE C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 3 3】

E C A T 2 遺伝子およびE C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する、請求項 3 2 記載の選択方法。

【請求項 3 4】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 2 6 記載の選択方法：

(a) ECAT4遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程。

【請求項35】

請求項21～25いずれか記載の体細胞の、請求項1～14いずれか記載のスクリーニング方法または請求項26～34いずれか記載の選択方法における使用。

【請求項36】

請求項1～14いずれか記載のスクリーニング方法において出現したマーカー遺伝子発現細胞または生存細胞、若しくは請求項26～34いずれか記載の選択方法において選択されたES様細胞。

【請求項37】

以下の(a)および(b)の工程を含む、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項38】

ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項37記載のスクリーニング方法。

【請求項39】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項37または38記載のスクリーニング方法。

【請求項40】

ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞である、請求項37～39いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項41】

ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するES細胞である、請求項40記載のスクリーニング方法。

【請求項42】

ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、請求項40または41記載のスクリーニング方法。

【請求項43】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項44】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる

工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項45】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項46】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項47】

ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、請求項46記載のスクリーニング方法。

【請求項48】

ES細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するES細胞である、請求項43～47いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項49】

以下の(a)および(b)の工程を含む、請求項37記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項50】

ES細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有するES細胞である、請求項49記載のスクリーニング方法。

【請求項51】

請求項37～50いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択されるES細胞の未分化・多能性維持物質。

【請求項52】

フィーダー細胞の分泌産物である、請求項51記載のES細胞の未分化・多能性維持物質。

【請求項53】

血清由来成分である、請求項51記載のES細胞の未分化・多能性維持物質。

【請求項54】

ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、請求項37～50いずれか記載のスクリーニング方法において用いるES細胞の供給源としての使用。

【請求項55】

ノックインマウスが、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、請求項54記載の使用。

【請求項56】

ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT

4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子およびO c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 5 4 または 5 5 記載の使用。

【請求項 5 7】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 5 4 ~ 5 6 いずれか記載の使用。

【請求項 5 8】

E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する E S 細胞。

【請求項 5 9】

E C A T 遺伝子がE C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子およびO c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 5 8 記載の E S 細胞。

【請求項 6 0】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 5 8 または 5 9 記載の E S 細胞。

【請求項 6 1】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、請求項 5 8 ~ 6 0 いずれか記載の E S 細胞。

【請求項 6 2】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、請求項 6 1 記載の E S 細胞。

【請求項 6 3】

請求項 5 8 ~ 6 2 いずれか記載の E S 細胞の、請求項 3 7 ~ 5 0 いずれか記載のスクリーニング方法における使用。

【書類名】明細書

【発明の名称】体細胞核初期化物質のスクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、体細胞核初期化物質の新規なスクリーニング方法に関する。より詳細には、本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES様細胞化をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、体細胞からES様細胞への変換を誘導する物質（体細胞の核初期化（Nuclear reprogramming）を誘導する物質）を効率的に同定する方法に関する。また本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES様細胞化をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、ES様細胞を効率的に選択する方法に関する。さらに本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES細胞の未分化・多能性維持（ES細胞としての状態維持）をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、ES細胞の未分化・多能性維持物質を効率的に選択する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

胚性幹細胞（ES細胞）は哺乳動物胚盤胞の内部細胞塊より樹立した幹細胞であり、すべての細胞へと分化する能力（分化多能性）を維持したまま、無限に増殖させることができ。この特性から、ES細胞から大量合成した心筋細胞や神経細胞を心筋梗塞やパーキンソン病患者に移植して治療する幹細胞療法が期待されている。しかしES細胞にはヒト受精卵を利用し、犠牲にするという致命的とも言える倫理的問題が存在する。一方、生体の各組織には神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞などの組織幹細胞が存在する。組織幹細胞は受精卵を使わないので倫理的問題が無く、また患者自身の細胞を使えるので拒絶反応も回避することができる。しかし組織幹細胞は単離が難しく、増殖能や分化能もES細胞に比べると比べものにならないほど限られている。組織幹細胞や分化細胞等の体細胞を何らかの手段により高い増殖能と分化多能性を有するES細胞に類似した細胞に変換することができたなら、このES様細胞は臨床応用にとって理想的な幹細胞となる。具体的には、例えば患者の体細胞を採取し、これを核初期化因子（核初期化を誘導する因子）で刺激してES様細胞に変換し、これを幹細胞として臨床応用することが期待される。しかしながら、そのような核初期化因子の探索を効率良く行える系は存在していない。

【0003】

ECAT遺伝子（ES cell associated transcript gene）は、ES細胞等の分化全能性細胞で特異的に発現する遺伝子の総称である。これまでにECAT遺伝子として報告されているものとしては、転写因子Oct3（Oct4、POU5f1とも呼ばれる。以下Oct3/4という）遺伝子が知られている。また、同様な遺伝子がヒトでも報告されているが（hOct3/4遺伝子；非特許文献1を参照）、hOct-3/4遺伝子についてはES細胞特異的な発現を証明したという報告はない。

【0004】

近年我々のグループは、ESTデータベースを利用したコンピューター解析およびノザンプロット解析に基づき、ES細胞で特異的に発現する9個の遺伝子を見出し、これをECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT遺伝子-6遺伝子、ECA T7遺伝子、ECAT8遺伝子、およびECAT9遺伝子と命名した（特許文献1を参照）。このうちECAT4はNanogとも呼ばれる因子であり、ES細胞が有する全能性（分化多能性）の維持に必須の因子であることが明らかとなった（非特許文献2を参照）。またECAT5はERasとも呼ばれる因子であり、ES細胞の増殖を促進する因子であることが明らかになっている（非特許文献3を参照）。

【0005】

またECAT3はF-box含有タンパクの1種、Fbx15であり、F-boxを有することからユビキチンリガーゼであると考えられている。ECAT3遺伝子の発現調節領域を解析した結果、ES細胞特異的転写因子であるOct4とSox2の2つにより協調的に発現調節を受けていることが明らかとなった（非特許文献4を参照）。

ECAT3の機能を調べるために、ECAT3遺伝子のコーディング領域に β geo（ β ガラクトシ

ダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子)をノックインして作製したノックインマウスを解析した結果、当該マウスには明らかな異常が認めらず、またホモ変異ES細胞にも増殖や分化能において明らかな異常は認められなかった。このことからECAT3遺伝子は、ES細胞の維持や増殖にとって必須の因子ではないと考えられている(非特許文献4を参照)。

【0006】

【特許文献1】WO 02/097090 号公報

【非特許文献1】Takeda et al., Nucleic Acids Research, 20:4613-4620(1992)

【非特許文献2】Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)

【非特許文献3】Takahashi, K., et al., Nature, 423: 541-545(2003)

【非特許文献4】Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、ECAT遺伝子を利用し、ES類似細胞を効率良く選択するシステムと、同システムを利用した体細胞(組織幹細胞、分化細胞)の核初期化物質のスクリーニング法を提供することにある。また本発明の別の目的は、ECAT遺伝子を利用した、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前述のように、体細胞を何らかの手段により高い増殖能と分化多能性を有するES細胞に類似した細胞に変換することができたなら、このES様細胞は臨床応用にとって理想的な幹細胞となる。本発明者はこのようなES様細胞への変換を誘導する物質(体細胞の核初期化物質)を効率的にスクリーニングすることの可能な方法につき鋭意検討した。

【0009】

本発明者はまず、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞を作製した。具体的には、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子である β geo遺伝子をノックインしたノックインマウスから体細胞(リンパ球)を調製した。この体細胞をES細胞の培養条件で培養し、G418で選択したところ、全て死滅し、薬剤耐性コロニーは一つも得られなかった。一方、前記体細胞を正常ES細胞と融合し、ES細胞の培養条件で培養し、G418で選択したところ、生存細胞が出現した。この生存細胞を解析した結果、ECAT4やOct3/4を発現し、ES細胞としての性質を有するES様細胞であることが分かった。以上の実験結果より、体細胞とES細胞との融合により体細胞の核が初期化(リ프로그ラミング)されたためにES様細胞が出現し、そしてECAT3遺伝子に置き換えられた β geoが発現して薬剤耐性となったことが明らかとなった。

【0010】

以上のようにECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞は、ES様細胞に変換された時にのみ、マーカー遺伝子を発現する。すなわちES様細胞への変換を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターすることができる。この性質を利用すれば、体細胞からES様細胞への変換を誘導する核初期化因子を、薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現を指標として効率的にスクリーニングすることができる。また同様に、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、ES様細胞を効率的に選択することができる。

本発明者らはさらに、ECAT3のみならず、ECAT2やECAT5等の他のECATに関しても、前記スクリーニングやES様細胞の選択に利用できることを見出した。ECAT遺伝子(ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子)はいずれもES細胞で特異的に発現する遺伝子であることが知られているため、いずれのECATについても前記のスクリーニングに用いることができる。特に、ECAT遺伝子をノックイン等の手法により破壊する場合には、

ES細胞の維持や増殖において必須ではないECAT2およびECAT3が非常に有効に利用される。

【0011】

さらに「ES様細胞への変換を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターする」という前記システムは、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニングにも応用することができる。マウスES細胞はサイトカインLIFにより未分化・多能性が維持できる。さらに細胞数が多いときはLIFを添加した無血清培地によりフィーダー細胞を用いずに維持することができる。しかし低密度では血清もしくはフィーダー細胞が必須である。これは血清やフィーダー細胞の分泌産物にLIF以外のES細胞維持因子が含まれることを示す。またヒトES細胞もマウスフィーダー細胞上で一部の細胞は未分化・多能性が維持されるが、全ての細胞を未分化状態で維持することはできない。さらにマウスES細胞と異なりヒトES細胞ではLIFは無効である。これはやはり、フィーダー細胞がLIF以外のES細胞未分化・多能性維持因子を分泌することを示唆すると同時に、フィーダー細胞分泌産物とも異なる更なる因子の必要性を示唆している。ヒトES細胞を臨床応用する場合、動物血清やフィーダー細胞を用いずに培養することが必須であり、ES細胞の未分化・多能性維持因子の同定が求められている状況にあるが、効率的な同定法は未だ見出されていない。

本発明の前記システムによれば、ES細胞状態を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターすることができるため、例えばES細胞状態を維持できない培養条件下に被験物質を添加し、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べることにより、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）物質を容易にスクリーニングすることができる。

本発明はこのような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0012】

すなわち本発明は、下記に掲げるものである：

(1) 以下の(a)および(b)の工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(2) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(1)記載のスクリーニング方法、

(3) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(1)または(2)記載のスクリーニング方法、

(4) 体細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞である、前記(1)～(3)いずれか記載のスクリーニング方法、

(5) 体細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、前記(4)記載のスクリーニング方法、

(6) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(4)または(5)記載のスクリーニング方法、

【0013】

(7) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(1)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(8) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(1)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(9) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(1)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(10) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(1)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(11) ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、前記(10)記載のスクリーニング方法、

(12) 体細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、前記(7)～(11)いずれか記載のスクリーニング方法、

(13) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(1)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(14) 体細胞が、ECAT遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する体細胞である、前記(13)記載のスクリーニング方法、

【0014】

(15) 前記(1)～(14)いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される核初期化物質、

(16) ES細胞由来の遺伝子またはタンパク質である、前記(15)記載の核初期化物質、

【0015】

(17) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、前記(1)～(14)いずれか記載のスクリーニング方法において用いる体細胞の供給源としての使用、

(18) ノックインマウスが、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、前記(17)記載の使用、

(19) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(17)または(18)記載の使用、

(20) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(17)～(19)いずれか記載の使用、

【0016】

(21) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞、

(22) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(21)記載の体細胞、

(23) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(21)または(22)記載の体細胞、

(24) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、前記(21)～(23)いずれか記載の体細胞、

(25) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、前記(24)記載の体細胞、

【0017】

(26) 以下の(a)および(b)の工程を含む、ES様細胞の選択方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択する工程、

(27) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(26)記載の選択方法、

(28) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(26)または(27)記載の選択方法、

(29) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT2遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(30) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(31) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT5遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(32) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(33) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する、前記(32)記載の選択方法、

(34) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法：

(a) ECAT4遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程

(35) 体細胞が、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を挿入したベクターを含有する体細胞である、前記(26)～(34)いずれか記載の選択方法、

(36) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(35)記載の選択方法、

【0018】

(37) 前記(21)～(25)いずれか記載の体細胞の、前記(1)～(14)いずれか記載のスクリーニング方法または前記(26)～(36)いずれか記載の選択方法における使用、

(38) 前記(1)～(14)いずれか記載のスクリーニング方法において出現したマーカー遺伝子発現細胞または生存細胞、若しくは前記(26)～(36)いずれか記載の選択方法において選択されたES様細胞、

【0019】

(39) 以下の(a)および(b)の工程を含む、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(40) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(39)記載のスクリーニング方法、

(41) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(39)または(40)記載のスクリーニング方法、

(42) ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞である、前記(39)～(41)いずれか記載のスクリーニング方法、

(43) ES細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するES細胞である、前記(42)記載のスクリーニング方法、

(44) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(42)または(43)記載のスクリーニング方法、

(45) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(46) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 3 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するE S細胞を、E S細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をE S細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(47) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 5 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するE S細胞を、E S細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をE S細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(48) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 2 遺伝子およびE C A T 3 遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するE S細胞を、E S細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をE S細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(49) E C A T 2 遺伝子とE C A T 3 遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、前記(48)記載のスクリーニング方法、

(50) E S細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するE S細胞である、前記(45)～(49)いずれか記載のスクリーニング方法、

(51) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(39)記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するE S細胞を、E S細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をE S細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(52) E S細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有するE S細胞である、前記(51)記載のスクリーニング方法、

【0020】

(53) 前記(39)～(52)いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択されるE S細胞の未分化・多能性維持物質、

(54) フィーダー細胞の分泌産物である、前記(53)記載のE S細胞の未分化・多能性維持物質、

(55) 血清由来成分である、前記(53)記載のE S細胞の未分化・多能性維持物質、

【0021】

(56) E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、前記(39)～(52)いずれか記載のスクリーニング方法において用いるE S細胞の供給源としての使用、

(57) ノックインマウスが、E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、前記(56)記載の使用、

(58) E C A T 遺伝子がE C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子およびO c t 3 / 4 遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(56)または(57)記載の使用、

(59) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(56)～(58)いずれか記載の使用、

【0022】

(60) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞、

(61) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(60)記載のES細胞、

(62) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(60)または(61)記載のES細胞、

(63) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、前記(60)～(62)いずれか記載のES細胞、

(64) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、前記(63)記載のES細胞、ならびに

(65) 前記(60)～(64)いずれか記載のES細胞の、前記(39)～(52)いずれか記載のスクリーニング方法における使用、に関する。

【発明の効果】

【0023】

本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法は、ES様細胞を効率良く選択できる方法であり、また体細胞の核初期化物質を効率的に同定できる方法である。核初期化物質は、幹細胞療法を現実化するために極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのような核初期化物質の早期発見が可能となる。さらに本発明のES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法は、ES細胞未分化・多能性維持物質を効率的に同定できる方法である。当該物質はES細胞の臨床応用において極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのようなES細胞未分化・多能性維持物質の早期発見が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

以下、本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定[IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(日本国特許庁編)、および当該分野における慣用記号に従う。

【0025】

本明細書において「ECAT遺伝子(ES cell associated transcript gene)」とは、ES細胞等の分化全能性細胞で特異的に発現する遺伝子の総称である。具体的には、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子、Oct3/4遺伝子が挙げられる(WO 02/097090号公報)。本明細書において「ECAT遺伝子」という用語を用いる場合、技術内容に応じて、ECATのcDNA(mRNA)のみならず、ECATのゲノムDNAを指す場合もある。

これらECAT cDNAのマウス型・ヒト型の塩基配列およびアミノ酸配列についてはWO 02/097090号公報に記載されている。本明細書の配列表においては、以下の配列番号に示される。

【0026】

【表1】

ECAT遺伝子	マウス型塩基配列	マウス型アミノ酸配列	ヒト型塩基配列	ヒト型アミノ酸配列
ECAT1	配列番号:1	配列番号:2	配列番号:3	配列番号:4
ECAT2	配列番号:5	配列番号:6	配列番号:7	配列番号:8
ECAT3	配列番号:9	配列番号:10	配列番号:11	配列番号:12
ECAT4	配列番号:13	配列番号:14	配列番号:15	配列番号:16
ECAT5	配列番号:17	配列番号:18	配列番号:19	配列番号:20
ECAT6	配列番号:21	配列番号:22		
ECAT7	配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26
ECAT8	配列番号:27	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30
ECAT9	配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33	配列番号:34
Oct3/4	配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38

【0027】

「ECAT遺伝子」（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）の範疇には、前記配列番号に示した塩基配列を含有する遺伝子のみならず、ES細胞に特異的に発現するという特徴を有する限り、これらの塩基配列に類似の塩基配列を含有する遺伝子も含まれる。

【0028】

ここで「類似の塩基配列を含有する遺伝子」とは、前記配列番号に示される塩基配列中、1若しくは複数個の塩基が消失、置換若しくは付加された塩基配列を含有する遺伝子や、前記配列番号で示される塩基配列と高い相同意を有する塩基配列を含有する遺伝子が挙げられる。

ここで「高い相同意を有する塩基配列を含有する遺伝子」とは、各ECAT遺伝子とストリジエントな条件でハイブリダイズする遺伝子を意味し、具体的には前記配列番号で示された塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同意を有する塩基配列を含有する遺伝子が挙げられる。ここでストリジエントな条件とは、ハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができ、所望の相同意に応じて設定されるが、例えば塩濃度：6×SC、温度：65℃の条件が挙げられる。

【0029】

また「ECAT」（ECAT1、ECAT2、ECAT3、ECAT4、ECAT5、ECAT6、ECAT7、ECAT8、ECAT9およびOct3/4）の範疇には、前記配列番号に示したアミノ酸配列を含有するタンパク質のみならず、ES細胞に特異的に発現するという特徴を有する限り、これらのアミノ酸配列に類似のアミノ酸配列を含有するタンパク質も含まれる。

ここで「類似のアミノ酸配列を含有するタンパク質」とは、前記類似の塩基配列を含有する遺伝子によりコードされるタンパク質を指す。

【0030】

本発明のスクリーニング方法は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞をスクリーニング用細胞として使用し、当該細胞に被験物質を接触させ、体細胞がES様細胞に変換されたことをマーカー遺伝子発現細胞の出現の有無でモニターすることにより、体細胞の核初期化物質（ES様細胞への変換物質）を効率的に同定する方法である。以下、本方法について具体的に説明する。

【0031】

(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法

本発明は、以下の(a)および(b)の工程：

- (a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法を提供する。

【0032】

前記で「ECAT遺伝子」とは、具体的には、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子が挙げられる。ここで「1または2以上」とは、具体的には1または2~3個のECAT遺伝子の組み合わせが挙げられ、好ましくは1個のECAT遺伝子、または2個のECAT遺伝子の組み合わせが挙げられる。具体的にはECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、またはこれらECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の組み合わせが例示される。

前記ECAT遺伝子は、マウス、ラット、ヒト、サル等如何なる種由来のECAT遺伝子であっても良いが、好ましくはマウス、ヒト由来のECAT遺伝子が挙げられる。

【0033】

前記で「マーカー遺伝子」とは、当該マーカー遺伝子を細胞に導入することにより、細胞の選別や選択を可能とするような遺伝子全般を指す。具体的には薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子が挙げられる。

【0034】

薬剤耐性遺伝子としては、具体的にはネオマイシン耐性遺伝子(neo)、テトラサイクリン耐性遺伝子(tet)、カナマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子(zeo)、ハイグロマイシン耐性遺伝子(hygro)等が挙げられる。各薬剤を含有する培地(選択培地)というで細胞を培養することにより、薬剤耐性遺伝子が導入・発現した細胞のみが生き残る。従って、選択培地で細胞を培養することにより、薬剤耐性遺伝子を含有する細胞を容易に選択することができる。

【0035】

蛍光タンパク質遺伝子としては、具体的にはGFP(緑色蛍光タンパク質)遺伝子、YFP(黄色蛍光タンパク質)遺伝子、RFP(赤色蛍光タンパク質)遺伝子、エクオリン遺伝子等が挙げられる。これら蛍光タンパク質遺伝子が発現した細胞は、蛍光顕微鏡で検出することができる。また蛍光強度の違いを利用することによりセルソーター等で分離・選択することや、細胞を限界希釈して1ウエルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、蛍光を発する細胞(ウエル)を蛍光顕微鏡下で検出することにより当該細胞を選択することができる。さらに、軟寒天培地などの上でコロニーを形成させ、蛍光顕微鏡下などでコロニーを選択することもできる。

【0036】

発光酵素遺伝子としては、具体的にはルシフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。これら発光酵素遺伝子を発現した細胞は、発光基質を加えて発光光度計で発光量を測定することにより検出することができる。また細胞を限界希釈して1ウエルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、各ウエルから一部の細胞を採取し、発光基質を加えて発光光度計で発光の如何を測定することにより当該細胞を選択することができる。

【0037】

発色酵素遺伝子としては、具体的には β ガラクトシダーゼ遺伝子、 β グルクロニダーゼ遺伝子、アルカリリフォスファターゼ遺伝子、又は分泌型アルカリリフォスファターゼであるSEAP遺伝子等が挙げられる。これら発色酵素遺伝子が発現した細胞は、発色基質を加えて発色の有無を観察することにより検出することができる。また細胞を限界希釈して1ウエルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、各ウエルから一部の細胞を採取し、発色基質を加えて発色の如何を観察することにより当該細胞を選択することができる。

【0038】

これらマーカー遺伝子の組み合わせに係る遺伝子としては、具体的にはネオマイシン耐性遺伝子（neo）とβガラクトシダーゼ遺伝子（β-gal）との融合遺伝子であるβgeo遺伝子が挙げられる。

【0039】

以上のようなマーカー遺伝子はいずれも当業者に周知であり、このようなマーカー遺伝子を含有するベクターはインビトロジェン社、アマシャムバイオサイエンス社、プロメガ社、MBL(医学生物学研究所)等から市販されている。

【0040】

前記マーカー遺伝子のうち、細胞の選択が容易であるという観点から、特に好ましいのは薬剤耐性遺伝子、または当該薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子である。

【0041】

前記において「体細胞」とは、ES細胞等の分化全能性細胞を除く全ての細胞を意味し、具体的には、(1) 神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、(2) 組織前駆細胞、または(3) リンパ球、上皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞等の分化した細胞が挙げられる。

【0042】

本発明のスクリーニング方法においては、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞を、スクリーニング用細胞として用いる。

ここで「発現調節領域」とは、遺伝子の発現（転写）を調節する領域のことであり、「プロモーター領域」、若しくは「プロモーター及びエンハンサー領域」を含む領域を意味する。

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法は、いろいろ知られており、当業者に周知の如何なる方法を用いてマーカー遺伝子を存在させても良い。大別すると、(1-1) 個体（マウス）を利用してマーカー遺伝子を存在させる場合と、(1-2) 個体を利用せずに細胞レベルでマーカー遺伝子を存在させる場合がある。以下に詳述する。

【0043】

(1-1) 個体（マウス）を利用してマーカー遺伝子を存在させる方法

個体（マウス）を利用してマーカー遺伝子を存在させる場合は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受けるゲノム上の位置にマーカー遺伝子を存在させる。この場合、ECAT遺伝子自身は、発現可能な形で存在していても良く、またECAT遺伝子が破壊された形で存在していても良い。

遺伝子の発現調節領域は、通常エクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、どのような位置に存在していても良い。

【0044】

(1-1-a) ECAT遺伝子を破壊する場合

ECAT遺伝子を破壊する方法は、当業者に周知の如何なる方法を用いても良いが、最も良く使われる手法としては、マーカー遺伝子を含有し、かつECAT遺伝子の任意の位置で相同組換えを起こすベクター（以下ターゲッティングベクターと称する）を用いて、相同組換えにより当該ECAT遺伝子を標的破壊し、代わりにマーカー遺伝子をこの位置に存在させる方法が挙げられる。このようにECAT遺伝子を破壊し、その位置にマーカー遺伝子を存在させることを、「ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインする」と言う。

このようなマーカー遺伝子をノックインする方法は種々知られているが、中でもプロモータートラップ法が好適に用いられる。当該プロモータートラップ法は、プロモーターを持たないターゲッティングベクターを相同組換えによりゲノム中に挿入し、相同組換えが正しく起こった場合に内在性プロモーター（ECAT遺伝子プロモーター）によりマーカー遺伝子が発現するというものである。以下、当該プロモータートラップ法によりECAT遺伝子

発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法につき具体例を示す。

【0045】

まず、ターゲッティングに必要な ECAT遺伝子のゲノム配列を決定する。当該ゲノム配列は、例えば公的データベースであるMouse Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>)等において既に公知である場合はこの配列情報を利用して配列決定ができる。また未知の場合は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35または37に記載のECAT遺伝子の一部をプライマーとして用い、当業者に入手可能なゲノムライブラリーをPCR法等でスクリーニングすることにより、所望のECAT遺伝子のゲノム領域を含有するゲノミッククローンを単離することや、ゲノム塩基配列を決定ができる。ここで用いるゲノムライブラリーとしては、例えばマウスBAC(bacterial artificial chromosome)ライブラリー(Invitrogen)やPAC(P1-derived artificial chromosome)ライブラリー(Invitrogen)等が挙げられる。

【0046】

次に、前記で同定したECAT遺伝子のゲノムDNA配列に基づき、マーカー遺伝子と置き換えるECAT遺伝子ゲノム領域を決定する(以下、ECATゲノム領域Aと称する)。このECATゲノム領域Aを挟む5'側領域(5'アーム)と3'側領域(3'アーム)を、ゲノムDNAを鑄型としてPCRを行うことなどにより増幅する。ここで鑄型となるゲノムDNAとしては、ECAT遺伝子を含有するマウスBACクローンのゲノムDNA等が挙げられる。PCRのプライマーは前記ECAT遺伝子ゲノムDNAの配列に基づき設計することができる。増幅した5'アームおよび3'アームを、プロモータートラップ用ターゲッティングベクターのマーカー遺伝子カセットを挟む両側に挿入する。ここで用いるプロモータートラップ用ターゲッティングベクターとしては、例えばIRES(internal ribosome entry site)- β geo(β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子)カセット(Mountford P. et al., Proc. Natl. Sci. USA, 91:4303-4307(1994))を含有するpBSSK(-)-IRES- β geoや、IRES-Hygro(ハイグロマイシン耐性遺伝子)カセットを含有する同様のベクターなどを挙げることができる。ここでIRES-Hygroカセットは、前記IRES- β geoカセットの β geo部分をHygro(Invitrogen)に置き換えることなどにより作製することができる。

次に作製されたターゲッティングベクターを制限酵素で消化して直鎖化し、これをエレクトロポレーション等によりES細胞に導入する。

【0047】

導入に用いるES細胞としては、たとえばRF8細胞(Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996))、JI細胞(Li, E. et al., Cell, 69:915-926(1992))、CGR8細胞(Nichols, J. et al., Development, 110:1341-1348(1990))、MG1.19細胞(Gassmann, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:1292-1296(1995))や、市販されているマウスES細胞129SV(No. R-CMTI-1-15, R-CMTI-1A)、マウスES細胞C57/BL6(No. R-CMTI-2A)、マウスES細胞DBA-1(No. R-CMTI-3A)(以上大日本製薬)等のES細胞が挙げられる。

【0048】

ターゲッティングベクターのES細胞への導入は、エレクトロポレーション(Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)等参照)、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド(Lipofectamine, Lipofectin; Invitrogen)を用いる方法などにより行われる。その後当該ターゲッティングベクターが導入されたES細胞を、用いたマーカー遺伝子(例えば薬剤耐性遺伝子)の特性に基づき選択する。選択されたES細胞において正しく相同組み換えが起こっていることはECAT遺伝子の一部をプローブとして用いたサザンプロット等により確認することができる。以上のようにしてECATゲノム遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有するES細胞を作製することができる。

【0049】

ES細胞の培養には、当業者に知られた如何なる培地を用いても良い。例えばRF8細胞の場合、以下の組成：15%FBS、0.1mM Non Essential Amino Acids (GIBCO BRL)、2mM L-glycine

utamine、50U/mlペニシリン-ストレプトマイシン、0.11mM 2-ME(GIBCO BRL)/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)の培地等が挙げられる。また市販の調製済み培地（例えば大日本製薬No.R-ES-101等）を用いることもできる。

【0050】

ES細胞の培養においてフィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞は、マウス胚から常法により調製した纖維芽細胞や纖維芽細胞由来のSTO細胞株 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)) を用いても良く、また市販品を用いても良い。市販品としては、例えば PMEF-N、PMEF-NL、PMEF-H、PMEF-HL（以上大日本製薬）などのフィーダー細胞が挙げられる。フィーダー細胞は、マイトイマイシンC処理することにより増殖を停止させた後にES細胞の培養に用いることが望ましい。

また、ES細胞の培養において前記フィーダー細胞を用いない場合は、LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を添加して培養を行うことができる。LIFとしてはマウス組み換えLIF、ラット組み換えLIF（ケミコン社等）などが用いられる。

【0051】

次に、前記ターゲッティングベクターを含有するES細胞をマウスに導入してノックアウトマウス（マーカー遺伝子ノックインマウス）を作製する。当該マーカー遺伝子ノックインマウスの作製方法は当業者に周知である。具体的には、前記ES細胞をマウス（例えばC57BL/6等）の胚盤胞 (blastocyst) にインジェクションし、偽妊娠させたメスのマウス (ICR等) の子宮内に移植することによりキメラマウスを作製する。その後キメラマウスと通常のマウス (C57BL/6等) とを交配させ、マーカー遺伝子がヘテロでノックインされたヘテロ変異マウスを作製する。ヘテロ変異マウス同士を交配させることにより、マーカー遺伝子がホモでノックインされたホモ変異マウスが得られる。

【0052】

本発明のスクリーニングで用いる体細胞は、前記ヘテロ変異マウスから単離された体細胞であっても、またホモ変異マウスから単離された体細胞であっても良い。しかしながら、本発明のスクリーニングにおける体細胞からES様細胞への変換ステップ、およびES様細胞の維持を可能とするために、ES細胞の維持に必須のECAT遺伝子をノックアウトした場合は、ヘテロ変異マウス由来の体細胞を用いる必要がある。当該ES細胞の維持に必須のECAT遺伝子としては、具体的にはECAT4遺伝子 (Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)) が挙げられる。一方、ES細胞の維持に必須でないECAT遺伝子をノックアウトする場合は、ヘテロ変異マウス由来の体細胞を用いても、ホモ変異マウス由来の体細胞を用いても良い。当該ES細胞の維持に必須でないECAT遺伝子としては、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT5遺伝子が挙げられる。すなわちECAT3遺伝子に関しては文献 (Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003)) に示されるように、ECAT5遺伝子に関しては文献 (Takahashi, K., et al., Nature, 423: 541-545(2003)) に示されるように、またECAT2遺伝子については後述の実施例において初めて明らかにされたように、これらのECATはES細胞の維持に影響を与えない因子である。このうちECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子はES細胞の維持だけでなく増殖にも影響を与えないため、ホモ変異マウス由来の体細胞を用いる場合は、ECAT2遺伝子またはECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたホモ変異ノックインマウス由来の体細胞を利用することができる。

【0053】

ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有することにより、ヘテロで含有した場合と比較して、マーカー遺伝子が2倍発現していることになるので、マーカー発現細胞の選択が正確かつ容易になるという利点がある。この観点からECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子は非常に有用なターゲットである。

【0054】

さらに、異なるECAT遺伝子のホモ変異マウス同士を交配させることにより、ダブルノックインマウスを作製することができる。例えばECAT2遺伝子のホモ変異マウスと、ECAT3遺伝子のホモ変異マウスを交配させることにより、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の両方がマーカー遺伝子に置き換えたダブルノックインマウスを作製することができる。その際、

各ECAT遺伝子には、それぞれ異なるマーカー遺伝子がノックインされていることが好ましい。この場合、2つの異なるマーカー遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子）により二重に選択することができるため、本発明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向かうことができる。

【0055】

具体的には、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えたダブルノックインマウス、ECAT2遺伝子とECAT4遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えたダブルノックインマウス、ECAT2遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えたダブルノックインマウス、ECAT3遺伝子とECAT4遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えたダブルノックインマウス、ECAT3遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えたダブルノックインマウス、ECAT4遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えたダブルノックインマウス、に由来する体細胞が例示される。好ましくはECAT2遺伝子とECAT3遺伝子がホモでマーカー遺伝子に置き換えたダブルノックインマウス由来の体細胞が挙げられる。

【0056】

(1-1-b) ECAT遺伝子を破壊しない場合

ECAT遺伝子を破壊することなく、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる手法としては、当該ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターまたはPACベクター等を、マウスやラット等の個体に導入して作製したトランスジェニック非ヒト動物を利用する手法が挙げられる。以下BACベクターを例にとり説明する。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACクローニングは、前記(1-1-a)に記述したように、ECAT遺伝子の配列情報に基づき単離・同定することができる。ECAT遺伝子含有BACクローニングにおいて、ECAT遺伝子の一部をマーカー遺伝子に置き換えるには、例えばRed/ET Recombination(Gene Bridges)を用いて容易に行うことができる。各ECAT遺伝子の発現調節領域は、通常、ECAT遺伝子のエクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、ECAT遺伝子上のどのような位置にマーカー遺伝子を存在させても良い。

【0057】

以上のようにして作製されたECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクター（以下、マーカー遺伝子含有BACベクターと称することがある）を導入したトランスジェニック動物を作製する方法は周知であり、例えば実験医学別冊「新遺伝子工学ハンドブック改訂第3版」（羊土社、1999年）等に基づき作製することができる。以下、マウスを例にとりトランスジェニック動物の作製につき説明する。

マウス受精卵への遺伝子の導入方法は特に限定されるものではなく、マイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法等により導入することができる。導入後、得られた卵細胞を培養し、仮親マウスの輸卵管に移植し、その後被移植マウスを飼育し、産まれた仔マウスから所望の仔マウスを選択する。当該選択は、例えば仔マウス由来のDNAをドットプロットハイブリダイゼーション法やPCR法で導入遺伝子の可否を調べることにより行うことができる。

前記仔マウスと野生型マウスとを交配させ、ヘテロトランスジェニックマウス（導入遺伝子をヘテロで含有するマウス）を作製する。ヘテロマウス同士を交配させることにより、マーカー遺伝子含有BACベクターをホモで含有するトランスジェニックマウスを得ることができる。

【0058】

本発明のスクリーニングで用いる体細胞は、前記ヘテロトランスジェニックマウスから

単離された体細胞であっても、またホモトランスジェニックマウスから単離された体細胞であっても良い。本トランスジェニックマウスにおいてはECAT遺伝子自身が発現しているため、前記ノックインマウスの場合と異なり、用いたECAT遺伝子がES細胞の維持に必須の遺伝子であるか否かを考慮する必要はない。よって、いずれのECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）についても等しく用いることができ、マーカー遺伝子発現量が多いという観点から、マーカー遺伝子をホモで含有するトランスジェニックマウスを利用することが好ましい。

【0059】

さらに、異なるECAT遺伝子のトランスジェニックマウス同士を交配させることにより、ダブルトランスジェニックマウスを作製することができる。その際、交配させる各トランスジェニックマウスは、それぞれ異なるマーカー遺伝子を含有していることが好ましい。この場合、2つの異なるマーカー遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子）により二重に選択することが可能となるため、本発明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向上できる。

【0060】

以上のノックインマウスまたはトランスジェニックマウスから単離する体細胞は、如何なる体細胞であっても良いが、その後のスクリーニングにおける取り扱いの容易さから、例えばリンパ球、皮膚細胞、纖維芽細胞などが挙げられる。これらの細胞は当業者に周知の手法にて単離することができる。

【0061】

以上のように、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした体細胞、またはマーカー遺伝子を導入した体細胞を、個体（マウス）レベルで維持することにより、あらゆる組織から、いつでも容易に体細胞を調製することが可能となるため、前記手法は非常に好ましい体細胞の供給方法である。

【0062】

(1-2) 個体を利用せずに細胞レベルでマーカー遺伝子を存在させる方法

個体を利用せずに、細胞内において、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法はいろいろ知られており、当業者に周知の如何なる方法を用いてマーカー遺伝子を存在させても良い。一般的には、マーカー遺伝子を含有するベクターを細胞に導入する方法が挙げられる。

【0063】

遺伝子導入に用いられる細胞は、体細胞であってもES細胞であっても良い。ここで用いる体細胞としては、マウス、ヒト、サル等の如何なる種に由来する体細胞であっても良い。当該体細胞は初代培養細胞であっても株化細胞であっても良く、具体的には、胎児纖維芽細胞（MEF）、骨髄由来間葉系幹細胞等の初代培養細胞や、NIH3T3のような株化細胞などが挙げられる。またES細胞としては、前記に挙げたマウスES細胞の他、ヒトやサルのES細胞も用いることができる。ここでヒトES細胞としては、KhES-1、KhES-2あるいはKhES-3（以上、京大再生研付属幹細胞医学研究センター）などが挙げられ、またサルES細胞としてはカニクイザルES細胞（旭テクノグラス）を挙げることができる。

【0064】

細胞へのベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド（Lipofectamine、Lipofectin； Invitrogen）を用いる方法などが挙げられる。

【0065】

導入に用いるベクターとしては、約300kbのDNAまでクローニング可能なベクターであるBACベクターやPACベクター、プラスミドベクター、さらには前記(1-1)に記載したターゲッティングベクターなどが挙げられる。以下これら各ベクターを用いてECAT遺伝子の発現

調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞を作製する方法について記載する。

【0066】

(1-2-a) BACベクター、PACベクターを用いる場合

ECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACベクターやPACベクターを利用することにより、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させることができる。以下BACベクターを例にとり説明する。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACクローン（以下ECAT遺伝子含有BACクローンと称する）は、前記(1-1)に記述したように、ECAT遺伝子の配列情報に基づき単離・同定することができる。ECAT遺伝子含有BACクローンにおいて、ECAT遺伝子の一部をマーカー遺伝子に置き換えるには、例えば Red/ET Recombination(Gene Bridges)を用いて容易に行うことができる。各ECAT遺伝子の発現調節領域は、通常、ECAT遺伝子のエクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、ECAT遺伝子上のどのような位置にマーカー遺伝子を存在させても良い。

【0067】

以上のようにして作製されたECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターを体細胞に導入することにより、本発明のスクリーニング用の体細胞とすることができます。ここで導入するBACベクターは1種類であっても、異なるECAT遺伝子を含有する2種類以上のBACベクターであっても良い。なお、当該BACベクター導入細胞を選択培地中で容易に選択できるように、BACベクター中に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子（以下第2の薬剤耐性遺伝子と称する）が挿入されていることが好ましい。この場合、体細胞での発現を可能するために、当該第2の薬剤耐性遺伝子の5'側または3'側に体細胞で発現するプロモーターが付加されている必要がある。また当該第2の薬剤耐性遺伝子は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に存在するマーカー遺伝子と同じ種類の薬剤耐性遺伝子であっても良く、異なる種類の薬剤耐性遺伝子であっても良いが、異なる種類の薬剤耐性遺伝子であることが望ましい。前記で同じ種類の薬剤耐性遺伝子を用いた場合は、第2の薬剤耐性遺伝子の両側にloxP配列またはFRT配列を付加しておき、BACベクター導入細胞を選択培地中で選択した後に、リコンビナーゼCreまたはFLPにより第2の薬剤耐性遺伝子を切り出すことができる。

前記と異なり、BACベクター中に第2の薬剤耐性遺伝子を挿入しない場合は、当該第2の薬剤耐性遺伝子を含有する第2の発現ベクターを、前記BACベクターと共に共導入（co-transfection）し、選択培地で選択しても良い。その場合、第2の発現ベクターよりもBACベクターを大過剰に用いて導入を行うことが望ましい。

【0068】

前記ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターをES細胞に導入した場合は、用いたマーカー遺伝子の性質に基づき、マーカー遺伝子が導入・発現しているES細胞を選択することができる。その後、当該ES細胞を体細胞に分化させることにより、本発明のスクリーニングに用いる体細胞とすることができる。ES細胞はフィーダー細胞の存在しない培養条件下で分化するため、このような条件下で分化させて得られた体細胞や、レチノイン酸等の当業者に知られた分化誘導剤で分化させて得られた体細胞を、本発明のスクリーニングに用いることができる。ここでES細胞から分化させた体細胞としては、例えば組織幹細胞、組織前駆細胞、または体細胞（神経細胞、皮膚角質細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、血液細胞、臍島細胞または色素細胞など）が挙げられる。

【0069】

(1-2-b) プロモーターを有さないプラスミドベクターを用いる場合

ECAT遺伝子の発現調節領域とマーカー遺伝子との融合遺伝子を、プロモーターを有さないプラスミドベクターに挿入し、細胞を形質転換することにより、本発明のスクリーニン

グ用の細胞を作製することができる。

ここで用いるベクターとしては、例えば pBluescript(Stratagene)、pCR2.1(Invitrogen)といったプロモーターを有さないプラスミドベクターが挙げられる。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域は、例えば該遺伝子の転写開始部位上流約1kb、好ましくは約2kbが挙げられる。

【0070】

各ECAT遺伝子の発現調節領域は、例えば(i)5'-RACE法（例えば、5' full Race Core Kit(宝酒造社製)等を用いて実施される）、オリゴキャップ法、S1プライマーマッピング等の通常の方法により5'末端を決定するステップ；(ii)Genome Walker Kit(クローンテック社製)等を用いて5'-上流領域を取得し、得られた上流領域について、プロモーター活性を測定するステップ；を含む手法等により同定することができる。このようにして同定したECAT遺伝子発現調節領域の3'側にマーカー遺伝子を融合し、これを前記プラスミドベクターに挿入することにより、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたプラスミドベクターを作製することができる。

以上のようにして作製したベクターを、前記(1-2-a)と同様にして体細胞やES細胞に導入することにより、本発明のスクリーニング用体細胞を作製することができる。

【0071】

(1-2-c)ターゲッティングベクターを用いる場合

前記(1-1)に記載したターゲッティングベクターを体細胞若しくはES細胞に導入することによっても、本発明のスクリーニング用体細胞を作製することができる。

前記ターゲッティングベクターを体細胞に導入する場合は、ベクター導入細胞を選択培地中で容易に選択できるように、前記(1-2-a)と同様に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子（第2の薬剤耐性遺伝子）をターゲッティングベクター上に存在させるか、またはターゲッティングベクターと共に第2の薬剤耐性遺伝子を含有する第2の発現ベクターを共導入(co-transfection)し、選択培地で選択して得られた体細胞を本発明のスクリーニングに用いることがより好ましい。その場合、第2の発現ベクターよりも前記ターゲッティングベクターを大過剰に用いて導入を行うことが望ましい。

【0072】

前記体細胞は、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有していても良く、またホモで含有していても良い。前述のようにECAT4遺伝子を利用する場合は前記ノックイン遺伝子をヘテロで含有することが望ましく、またECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子およびECAT5遺伝子（特にECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子）を利用する場合は、前記ノックイン遺伝子をホモで含有することが望ましい。ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞は、ノックイン遺伝子をヘテロで含有する体細胞に、さらにノックイン遺伝子（マーカー遺伝子を含有するターゲッティングベクター）を導入することにより作製することができる。またノックイン遺伝子をヘテロで含有する体細胞を高濃度の薬剤を含む選択培地で培養することによっても、選択することができる。

さらに、前記ノックイン遺伝子をホモで含有する体細胞に対して別のノックイン遺伝子（別のECAT遺伝子がノックアウトされた遺伝子）を導入することにより、前記(1-1)と同様のダブルノックイン細胞を作製することができる。

【0073】

前記ターゲッティングベクターをES細胞に導入する場合は、ターゲッティングベクター上のマーカー遺伝子の性質に基づいて、マーカー遺伝子導入・発現細胞を選択することができる。当該ES細胞も、前記体細胞と同様、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有していても良く、またホモで含有していても良い。ホモ変異細胞の作製法としては、後述の実施例3に記載のECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞の作製法を参照されたい。なお、ES細胞から体細胞への誘導方法は、前記(1-2-a)と同様である。

【0074】

本発明のスクリーニング工程(a)においては、以上のようにして作製した体細胞と、被験物質とを接觸させる。

ここで用いられる被験物質は、制限されないが、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明のスクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料（被験試料）を前記体細胞と接触させることにより行われる。かかる被験試料としては、細胞抽出液、遺伝子（ゲノム、cDNA）ライブラリー、RNAiライブラリー、アンチセンス核酸、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。具体的には、実施例に示したES細胞、またはES細胞の抽出液（抽出画分）、ES細胞由来のcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリー、増殖因子などが挙げられる。

これら被験試料は、体細胞への取り込み可能な形態で体細胞と接触させる。例えば被験試料が核酸（cDNAライブラリー等）の場合は、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランや遺伝子導入用リピッドを用いて体細胞に導入する。

【0075】

体細胞と被験物質とを接触させる条件は、該細胞が死滅せず且つ被験物質が取り込まれるのに適した培養条件（温度、pH、培地組成など）であれば特に制限はない。

前記体細胞と被験物質との接触の前に、接触の際に、若しくは接触後に、ES細胞の培養条件で細胞培養を行う。ES細胞の培養は、当業者に知られた如何なる方法を用いても良い。例えばRF8細胞の場合、以下の組成：15%FBS、0.1mM Non Essential Amino Acids (GIBCO BRL)、2mM L-glutamine、50U/mlペニシリン-ストレプトマイシン、0.11mM 2-ME (GIBCO BRL)/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)の培地等が挙げられる。また市販の調製済み培地（例えば大日本製薬No.R-ES-101等）を用いることもできる。

【0076】

ES細胞の培養においてフィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞は、マウス胚から常法により調製した纖維芽細胞や纖維芽細胞由来のSTO細胞株 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)) を用いても良く、また市販品を用いても良い。市販品としては、例えば PMEF-N、PMEF-NL、PMEF-H、PMEF-HL (以上大日本製薬)などのフィーダー細胞が挙げられる。フィーダー細胞は、マイトイソトープ処理することにより増殖を停止させた後にES細胞の培養に用いることが望ましい。

また、ES細胞の培養において前記フィーダー細胞を用いない場合は、LIF (Leukemia Inhibitory Factor) を添加して培養を行うことができる。LIFとしてはマウス組み換えLIF、ラット組み換えLIF (ケミコン社等) などが挙げられる。

前記ES細胞の培養条件における培養日数は、細胞の状態等により適宜変更できるが、1日～3日程度が好ましい。

【0077】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で選択を行う。当該薬剤は、体細胞と被験物質との接触の際に培地に含まれていても良く、また接触後に含ませても良い。さらに、ES細胞の培養条件で培養した後に前記薬剤を培地に含ませても良い。

【0078】

前記工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する（工程(b)）。以下当該工程(b)について記述する。

【0079】

マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子の場合は、前記のように選択培地で培養することによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

マーカー遺伝子発現細胞が認められた場合、ここで用いた被験試料（被験物質）を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

前記スクリーニングは、必要に応じて何度も繰り返し行うことができる。例えば1回目のスクリーニングでcDNAライブラリーや細胞抽出物といった混合物を用いた場合、2回

目以降は、さらに当該混合物を細分化（分画）して同様のスクリーニングを繰り返し行うことにより、最終的に、体細胞核初期化因子の候補物質を選択することができる。

【0080】

以下、前記本発明のスクリーニング方法の具体例として、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子およびECAT5遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法につき例示するが、いずれのECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）についても以下を参考にして同様のスクリーニングを実施することができる。

【0081】

例1：ECAT2遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT2遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- (a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

【0082】

後述の実施例に示したように、ECAT2遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス（ECAT $2^{\beta geo/\beta geo}$ マウス）は、例えば後述の実施例3に記載の方法で作製することができる。このECAT $2^{\beta geo/\beta geo}$ マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418(0.25mg/ml)で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0083】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

【0084】

例2：ECAT3遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT3遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- (a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

【0085】

後述の実施例に示したように、ECAT3遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス（ECAT $3^{\beta geo/\beta geo}$ マウス）は、例えば後述の実施例1に記載の方法で作製することができる。このECA

$T3^{\beta\text{ geo}}/\beta\text{ geo}$ マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0086】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0087】

例3：ECAT4遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT4遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- (a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含むスクリーニング方法が例示される。

【0088】

ECAT4遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子である。従って、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行う。

ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたノックインマウス ($ECAT4^{\beta\text{ geo}}/+$ マウス) の作製は、文献 (Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)) に記載の方法等で作製することができるが、簡単に述べると以下の方法が例示される。

【0089】

マウスECAT4遺伝子のエクソン2を、IRES- $\beta\text{ geo}$ カセット (Mountford et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4303-4307(1994)) で置き換えるためのターゲッティングベクターを以下のように作製する。ECAT4のイントロン1を含有する4kbフラグメントを、マウスゲノムDNAを鋳型とし、プライマー (AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG (配列番号：39)、AGGCAGGTCTTCAG AGGAAGGGCG (配列番号：40)) を用いてPCRで増幅することにより5'側アームを作製する。またエクソン3-イントロン3-エクソン4を含有する1.5kbフラグメントを、マウスゲノムDNAを鋳型とし、プライマー (CGGGCTGTAGACCTGTCTGCATTCTG (配列番号：41)、GGTCCTTCTGT CTCATCCTCGAGAGT (配列番号：42)) 用いてPCRで増幅することにより3'側アームを作製する。これら5'側アームと3'側アームをIRES- $\beta\text{ geo}$ カセットにライゲートし、ターゲッティングベクターを作製する。このターゲッティングベクターをSacIIで切断し、エレクトロポレーションによりRF8 ES細胞に導入する (Meiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 : 14041-14046(1996) 参照)。その後G418選択培地にて、相同組み換えが正しく起こったクローニングを選択する。この $\beta\text{ geo}$ との相同組み換えES細胞をマウスのプラストシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウス ($ECAT4^{\beta\text{ geo}}/+$ マウス) を樹立する。

【0090】

次にこの $ECAT4^{\beta\text{ geo}}/+$ マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対

してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0091】

例4：ECAT5遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT5遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)

：

- (a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含むスクリーニング方法が例示される。

【0092】

後述の実施例に示したように、ECAT5遺伝子はES細胞の維持に必須の因子ではない。従って、ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行なうことが好ましい。

ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス ($\text{ECAT5}^{\beta\text{ geo}}/\beta\text{ geo}$ マウス) は、例えば後述の実施例2に記載の方法 (特開2003-265166号公報) で作製することができる。この $\text{ECAT5}^{\beta\text{ geo}}/\beta\text{ geo}$ マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件 (例えばMeiner, V. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照) でフイーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0093】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0094】

例5：2つのECAT遺伝子を利用したスクリーニング

前述のように、2つの異なるECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたホモ変異マウス同士を交配させることによりダブルノックインマウスを作製することができ、当該マウス由来の体細胞をスクリーニングに用いることができる。具体的には、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の組み合わせに係るダブルノックインマウス由来の体細胞を用いたスクリーニング方法が例示される。すなわちECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)：

- (a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含むスクリーニング方法が例示される。

【0095】

ここでノックインされる薬剤耐性遺伝子は、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子とで異なっていることが望ましい。この場合、2つの異なる薬剤耐性遺伝子 (例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子) により二重に選択することが可能となるため、本発

明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向上される。

【0096】

ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子のダブルノックインマウス (ECAT2^{Hygro/Hygro} ECAT3 ^{β geo/ β geo}マウス) は、後述の実施例1および3 (ただし薬剤耐性遺伝子がハイグロマイシン耐性遺伝子) で作製したECAT2^{Hygro/Hygro}マウスとECAT3 ^{β geo/ β geo}マウスとを交配されることにより得ることができる。このECAT2^{Hygro/Hygro} ECAT3 ^{β geo/ β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件 (例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照) でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418(0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。この選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0097】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0098】

本発明のスクリーニングで選択された体細胞核初期化(候補)物質が体細胞の核を初期化するか否かは、(1) 当該核初期化(候補)因子により体細胞から変換されたES様細胞がOct3/4やEcat4(Nanog)といったES細胞のマーカー遺伝子を発現しているか否か、(2) 前記ES細胞が in vitroにおいてレチノイン酸刺激等で分化するか否か、(3) 前記ES細胞をマウスプラストシストにインジェクションしてキメラマウスが誕生するか等を調べることにより、確認することができる。

【0099】

(2) 本発明の核初期化物質

本発明は、前記本発明のスクリーニング方法を用いて選択される体細胞核初期化物質を提供する。当該核初期化物質は、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物のいずれかである。後述の実施例で用いたES細胞も体細胞核初期化物質の1つである。好ましくは、ES細胞由来の遺伝子またはタンパク質が例示される。本発明の核初期化物質は、幹細胞療法において有用である。すなわち、患者から体細胞(組織幹細胞、分化細胞)を採取し、これに本発明の核初期化物質を添加することにより、ES様細胞が出現する。このES様細胞をレチノイン酸、増殖因子(例えはEGF、FGF-2、BMP-2、LIF等)、またはグルココルチコイドなどにより、神経細胞、心筋細胞または血球細胞などに分化させ、これを患者に戻すことにより、幹細胞療法を達成することができる。

【0100】

(3) 本発明のノックインマウスの新規用途(本発明スクリーニング用体細胞の供給源としての使用)

従来、ある遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたノックインマウスは、その遺伝子の機能解析のために利用されてきた。また場合によっては疾患モデル動物となり得るケースもあった。しかしながら本発明で開示された新たなスクリーニング方法で用いる体細胞の供給源としての利用はなされていない。

本発明は、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、本発明のスクリーニングにおいて用いる体細胞の供給源としての用途を提供するものである。

【0101】

当該ノックインマウスの作製法等については、前記(1)本発明のスクリーニング方法および後述の実施例において詳しく述べた通りである。当該ノックインマウスは、ECAT2遺

伝子、ECAT3遺伝子及び/又はECAT5遺伝子を用いる場合は、当該遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を、ホモで含有することが好ましい。一方、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を用いる場合はヘテロで含有することが好ましい。マーカー遺伝子としては、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子が挙げられる。中でも薬剤耐性遺伝子を含有する遺伝子が好ましい。

【0102】

(4) 本発明の体細胞

本発明は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞を提供する。

当該体細胞の作製法等については、前記(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法および後述の実施例において詳しく述べた通りである。本発明の体細胞は、前記本発明のスクリーニング方法、または後述の本発明のES様細胞の選択方法において、有効に使用される。

【0103】

(5) 本発明のES様細胞の選択方法

本発明はまた、以下の(a)および(b)の工程：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法を提供する。

【0104】

前記本発明のスクリーニング方法において述べたようなECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞は、ES様細胞の選択のためにも有効に用いられる。例えば幹細胞療法を念頭においていた場合、ヒトの体細胞を核初期化物質で刺激することにより出現したES様細胞を、他の細胞（体細胞）から分離（純化）し、後の治療に用いることが望ましい。前述のように、本発明のシステムは、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子の発現を指標として、ES様細胞を容易に選択できるシステムであるため、ES様細胞を選択・分離する際に有効に用いることができる。

本発明のES様細胞の選択方法は、前記ヒトの治療のみならず、イン・ビトロおよびイン・ビボでのES細胞関連の様々な研究において、ES細胞を選択（分離）する如何なる目的においても使用することができる。

【0105】

前記において、1) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞の作製方法、2) 当該体細胞と体細胞核初期化物質との接触方法、および3) マーカー遺伝子発現細胞の選択方法については、全て「(1) 本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法」に記述したものと同様である。なお、マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は選択培地で培養することにより、マーカー遺伝子発現細胞を容易に選択（分離）することができる。またマーカー遺伝子として蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、または発色酵素遺伝子を用いた場合は、セルソーター、限界希釈法または軟寒天コロニー法などを利用することにより、当該細胞を選択（分離）することができる。

前記で「核初期化物質」とは前記本発明のスクリーニングで得られるような、体細胞の核初期化に関与する物質を指す。なお、後述の実施例においては、体細胞の核初期化物質としてES細胞自身を用いることにより、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択している。

【0106】

本発明のES様細胞選択方法においては、如何なるECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）も使用することができる。具体例として、以下に示

した選択方法が例示される。

すなわちECAT2遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT2遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0107】

またECAT3遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0108】

またECAT5遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT5遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0109】

またECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0110】

またECAT4遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

- (a) ECAT4遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0111】

以上のようなES様細胞の選択方法において用いる体細胞は、ヒトの治療を念頭においていた場合は、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を挿入したベクターを含有するヒト体細胞であることが望ましい。具体的には以下のようにして作製された体細胞が用いられる。

【0112】

すなわちまず、患者の体細胞をヒトから単離することなどにより調製する。体細胞としては、疾患に関与する体細胞、疾患治療に関与する体細胞などが挙げられる。このヒト体細胞に対し、前記(1-2)の項に記載のいずれかのベクターを導入する。具体的にはBACベクター(ECAT遺伝子の発現調節領域の下流にマーカー遺伝子を存在させたBACベクター)またはPACベクターを導入することが望ましい。ここで導入するBACベクター(PACベクター)は1種類であっても、異なるECAT遺伝子を含有する2種類以上のBACベクターであっても良い。このBACベクター導入細胞に対して核初期化物質を添加することにより、ES様細胞を出現させる。このES様細胞を、用いたマーカー遺伝子の性質に応じて選択する。例えばマーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を用いた場合は、核初期化物質添加後に選択培地で選択することにより、薬剤耐性を指標として、ES様細胞を容易に選択することができる。

【0113】

(6) 本発明のES様細胞

本発明は、本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニングにより出現したマーカー遺伝

子発現細胞（ES様細胞）、および本発明のES様細胞の選択方法により選択されたES様細胞を提供する。当該ES様細胞は、その後のインビトロおよびインビボでの評価において有効に用いることができる。すなわち当該ES様細胞の分化誘導能や、分化誘導した細胞の個体（マウス等）への移植定着などを調べることは、ヒトにおける幹細胞療法の予備検討やES細胞に関わる種々の研究において極めて重要である。本発明のES様細胞は、そのような研究や検討において有効に用いられる。

さらに本発明のES様細胞の選択法により出現したヒトのマーカー遺伝子発現細胞（ES様細胞）を、レチノイン酸、増殖因子（例えはEGF、FGF-2、BMP-2、LIF等）、またはグルココルチコイドなどにより、神経細胞、心筋細胞または血球細胞などに分化させ、これを患者に戻すことにより、幹細胞療法を達成することができる。

【0114】

(6) 本発明のES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法

本発明は、以下の(a)および(b)の工程：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、を含むES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法を提供する。

【0115】

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたES細胞を、ES細胞としての状態（未分化・多能性）を維持できない培地中で培養した場合、マーカー遺伝子の発現は消失する。一方、前記培地中にES細胞の未分化・多能性維持物質が存在していれば、マーカー遺伝子の発現は存続する。この性質を利用することにより、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）物質を容易にスクリーニングすることができる。

【0116】

前記スクリーニング工程(a)において用いられるES細胞としては、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞であればどのようなものであっても良い。具体的には、例えは、前記(1-1-a)に記載されたノックインマウス由来のES細胞、前記(1-1-b)に記載されたトランスジェニックマウス由来のES細胞、前記(1-2-a)に記載されたBACベクター若しくはPACベクターを含有するES細胞、前記(1-2-b)に記載されたプラスミドベクターを含有するES細胞、若しくは前記(1-2-c)に記載されたターゲッティングベクターを含有するES細胞を挙げることができる。

【0117】

前記スクリーニング工程(a)において用いられる「ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地」とは、ES細胞としての状態を維持できない培地、未分化状態を維持できない培地であれば、どのような培地であっても良い。例えはマウスES細胞は、低密度では、その維持（未分化・多能性維持）に血清またはフィーダー細胞が必須であることが知られているため、当該ES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件が挙げられる。またヒトES細胞の維持（未分化・多能性維持）にはフィーダー細胞が必須であるため、ヒトES細胞の培養条件からフィーダー細胞を除去した条件が挙げられる。さらにヒトES細胞の場合はフィーダー細胞存在下でも分化する細胞が出現するため、フィーダー細胞存在下の培養条件でも良い。

具体的には、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p 14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件などが例示される。

【0118】

前記工程(a)は、前記ES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させることにより行われる。被験物質は、ES細胞を未分化・多能性非維持培地に移す前に、また移す際に、若しくは移した後に、当該ES細胞と接触させる。

本スクリーニングで用いられる被験物質は、制限されないが、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明のスクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料（被験試料）を前記ES細胞と接触させることにより行われる。かかる被験試料としては、細胞分泌産物、血清、細胞抽出液、遺伝子（ゲノム、cDNA）ライブラリー、RNAiライブラリー、アンチセンス核酸、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。具体的には、動物血清またはその画分、フィーダー細胞の分泌産物またはその画分などが挙げられる。

これら被験試料は、体細胞への取り込み可能な形態で体細胞と接触させる。例えば被験試料が核酸（cDNAライブラリー等）の場合は、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランや遺伝子導入用リピッドを用いて体細胞に導入する。

【0119】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で選択を行う。当該薬剤は、ES細胞と被験物質との接触の際に培地に含まれていても良く、また接触後に含ませても良い。さらに被験物質存在下、ES細胞の未分化・多能性非維持培地中で培養した後に前記薬剤を培地に含ませても良い。

【0120】

前記工程(a)の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞の未分化・多能性維持の候補物質として選択する（工程(b)）。当該工程(b)については、前記「(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法」に記載した通りである。マーカー遺伝子発現細胞が認められた場合、ここで用いた被験試料（被験物質）を、ES細胞の未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

前記スクリーニングは、必要に応じて何度も繰り返し行うことができる。例えば1回目のスクリーニングでフィーダー細胞分泌産物や血清といった混合物を用いた場合、2回目以降は、さらに当該混合物を細分化（分画）して同様のスクリーニングを繰り返し行うことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持の候補物質を選択することができる。

なお、前記のように被験試料として混合物を用いてスクリーニングを行った場合、ES細胞の未分化・多能性維持物質と共にES細胞の増殖促進物質も選択される可能性がある。すなわち、ある混合物（画分A）を前記本発明のスクリーニング方法に供し、生存細胞が確認され且つ当該生存細胞の細胞数が増加した場合には、当該画分中には、ES細胞の未分化・多能性維持物質と共に、ES細胞の増殖促進物質も含まれていると考えられる（もちろん1つの物質が両方の性質を兼ね備えている場合もある）。その場合、当該画分Aをさらに分画し、片方の画分（画分B）を本発明のスクリーニングに供した場合には生存細胞が確認されるが細胞数の増加は認めらず、もう片方の画分（画分C）を本発明のスクリーニングに供した場合は生存細胞が認められなかった場合、画分BにはES細胞の未分化・多能性維持物質が含まれ、画分CにはES細胞の増殖促進物質が含まれることが考えられる。本発明のスクリーニングは、そのようなES細胞の増殖促進（候補）物質の選択にも有用である。

【0121】

以下、前記スクリーニング方法の具体例として、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子およびECAT5遺伝子を利用したスクリーニング方法につき例示するが、他のECAT遺伝子についても以下を参考にして同様に実施することができる。

【0122】

例1：ECAT2遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT2遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

- (a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

を含むスクリーニング方法が例示される。

【0123】

後述の実施例に示したように、ECAT2遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞は、例えば実施例3に記載の方法で作製することができる（ECAT2遺伝子ホモ変異RF8 ES細胞）。このES細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418（0.25mg/ml）およびハイグロマイシン（0.1mg/ml）で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

【0124】

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進（候補）物質を選択することもできる。

【0125】

例2：ECAT3遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT3遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

- (a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

【0126】

後述の実施例に示したように、ECAT3遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞は、例えば、実施例1で作製した β geoベクターとの相同組み換えES細胞に対して、さらにHygroベクター（ECAT3遺伝子をHygro遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベクター）を導入することにより、ECAT3遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を作製することができる。この細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418（0.25mg/ml）およびハイグロマイシン（0.1mg/ml）で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

【0127】

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進（候補）物質を選択することもできる。

【0128】

例3：ECAT4遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT4遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、
 を含むスクリーニング方法が例示される。

【0129】

ECAT遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子である。従って、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行う。

ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたES細胞は、前記ECAT2やECAT3と同様にターゲッティングベクター（例えばECAT4遺伝子を β geo遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベクター）をES細胞に導入・相同組み換えを起こすことにより作製することができる。この細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418（0.25mg/ml）で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

【0130】

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進（候補）物質を選択することもできる。

【0131】

例4：ECAT5遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT5遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
 (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、
 を含むスクリーニング方法が例示される。

【0132】

後述の実施例に示したように、ECAT5遺伝子はES細胞の維持に必須の因子ではない。従って、ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞の作製法およびそれを用いたスクリーニング法は、前記ECAT2やECAT3の場合と同様である。

【0133】

前記本発明のスクリーニングにより選択されたES細胞の未分化・多能性維持（候補）物質がES細胞の未分化・多能性を維持するか否かは、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中に当該候補物質を添加した培養条件下でES細胞を培養し、ES細胞としての種々の能力を調べることにより、確認することができる。具体的には、例えば前記培養条件下で培養したES細胞が、(1) Oct3/4やEcat4(Nanog)といったES細胞のマーカー遺伝子を発現しているか否か、(2) 前記ES細胞が in vitroにおいてレチノイン酸刺激等で分化するか否か、(3) 前記ES細胞をマウスプラストシストにインジェクションしてキメラマウスが誕生するか等を調べることにより、確認することができる。

【0134】

(7) 本発明のES細胞未分化・多能性維持物質

本発明は前記スクリーニング方法を用いて選択されるES細胞未分化・多能性維持物質を提供する。当該ES細胞の未分化・多能性維持物質は、核酸、ペプチド、タンパク質、有機

化合物、無機化合物のいずれかであり、好ましくは、フィーダー細胞分泌産物または血清由来成分が例示される。本発明のES細胞未分化・多能性維持物質は、ES細胞の臨床応用において有用である。すなわち臨床応用においては、ヒトES細胞またはそれから分化させた分化細胞を無血清下、フィーダー細胞非存在下で培養することが必須となるため、本発明のES細胞未分化・多能性維持物質の無血清培地への添加により、前記ES細胞の臨床応用が可能となる。

【0135】

(8) 本発明のノックインマウスの新規用途（本発明スクリーニング用ES細胞の供給源としての使用）

本発明は、本発明のノックインマウスの、ES細胞未分化・多能性維持物質スクリーニング用のES細胞の供給源としての用途を提供する。本発明のノックインマウスについては前記(3)に記載した通りである。ノックインマウスからのES細胞の単離は、当業者に周知の手法により行うことができる。

【0136】

(9) 本発明のES細胞

本発明は、ECAAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を提供する。当該ES細胞の作製法等については、前記(1)および(6)において詳しく述べたとおりである。本発明のES細胞は、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法において有効に使用される。

【0137】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなら限定されるものではない。

【実施例1】

【0138】

ECAT3遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT3遺伝子のコーディング領域を β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子(β geo)に置き換え、ECAT3遺伝子をノックアウトするとともに、ECAT3遺伝子の発現をX-Gal染色や薬剤耐性でモニターできるようにしたホモ変異ノックインマウス（以下、ECAT3 $^{\beta\ geo/\beta\ geo}$ マウス）を作製した。このECAT3 $^{\beta\ geo/\beta\ geo}$ マウスの作製は文献（Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003)）の記載に基づき行った。簡単に述べると以下のようになる。

【0139】

まず、マウスECAT3遺伝子を含有するBACクローンを、ECAT3 cDNAの一部をプライマーに用いたPCRスクリーニングにより、BACライブラリー(Research Genetics)のDNAプールから同定し、塩基配列を決定した。

マウスECAT3遺伝子のエクソン3～エクソン7を、IRES- β geoカセット(Mountford et al ., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4303-4307(1994))で置き換えるためのターゲッティングベクターを以下のように作製した。ECAT3のイントロン1～エクソン3を含有する1.4kbフラグメントを、前記マウスBAC DNAを鑄型とし、プライマー(ACCAAGGTCACCGCATCCAA(配列番号:43)、CTTCACCAAGATTCCGATG(配列番号:44))を用いてPCRにより増幅することにより5'側アームを作製した。またエクソン7～エクソン8を含有する3.5kbフラグメントを、マウスBAC DNAを鑄型とし、プライマー(GAATGGTGGACTAGCTTTG(配列番号:45)、TGCCATGAA TGTCGATATGCAG(配列番号:46))を用いてPCRにより増幅することにより3'側アームを作製した。これら5'側アームと3'側アームを β geoカセットにライゲートし、ターゲッティングベクターを作製した。このターゲッティングベクターをNotIで切断し、エレクトロポレーションによりRF8 ES細胞(Meiner et al ., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 93: 14041-14046(1996))に導入した。G418選択培地にて、相同組み換えが正しく起こったクローンを選択した。この β geoとの相同組み換えES細胞をマウス(C57BL/6)のプラスミドにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウス(ECAT3 $^{\beta\ geo/+}$ マウス)を樹立し、さらにヘテロ変異マウス同士の交配から、ホモ変異マウス(ECAT3 $^{\beta\ geo/\beta\ geo}$ マウ

ス)がメンデルの法則に従って誕生した。

【0140】

次に、ECAT3 β geo/ β geoマウスの胸腺から常法によりリンパ球を採取した。この細胞を文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件で2日間培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択した。その結果、これらリンパ球はすべて死滅し、薬剤耐性コロニーは一つも得られなかった。またこのG418濃度では正常ES細胞はすべて死滅することも確認された。

【0141】

次に、ECAT3 β geo/ β geoマウス由来のリンパ球とRF8細胞とを、多田らの方法 (Tada, M., et al., Curr. Biol., 11(19): p1553-1558(2001)) に従って電気的に融合し、前記ES細胞の培養条件でフィーダー細胞 (STO細胞) 上で2日間培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択したところ、多数のES細胞様コロニーが得られた。これらのコロニーを単離、培養し、RNAを回収した。ノザンプロットによりこれらの細胞は全クローンにおいてOct3/4やECAT4 (Nanog) を発現しており、またこのクローンをマウスプラストシストに移植したところキメラマウスが形成されたことから、G418で選択された細胞は確かにES細胞としての性質を有するES様細胞であることが明らかとなった (図1)。これらの細胞をフローサイトメトリー (FACS) で解析したところ、大きさ (Forward scatter) は約2倍となり、DNA量も4倍体となっていた (図2)。以上のことから、これらのコロニーはECAT3 β geo/ β geoマウス由来のリンパ球と正常ES細胞との融合により、リンパ球核の初期化 (ES細胞化) が起きたためにG418耐性になったことが分かった。このようにECAT3 β geo/ β geoマウス由来の体細胞は、ES様細胞に変換された時の薬剤耐性となる。従ってこの性質を利用すれば、ES様細胞の選択や、ES様細胞への変換を誘導する核初期化因子を容易にスクリーニングできることが明らかとなった。

【実施例2】

【0142】

ECAT5遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT5遺伝子のコーディング領域を β geoに置き換えたホモ変異ノックインマウス (ECAT5 β geo/ β geoマウス) を文献 (Takahashi, K., K. Mitsui, and S. Yamanaka, Nature, 423(6939): p541-545(2003)、特開2003-265166号公報) 記載の方法に基づき作製した。このECAT5 β geo/ β geoマウス由来のリンパ球を用いて、上記と同様のプロトコールで実験を行った。ECAT5 β geo/ β geoマウス 2×10^6 個のリンパ球を 4×10^5 個のES細胞と融合し、G418で選択培養したところ、実施例1で行ったECAT3の場合よりは数が少ないものの、同様のES細胞様コロニーが得られた。よってECAT5も同様にES様細胞の選択システムに利用できることが分かった。

【0143】

なおECAT3の場合よりもコロニー数が少なかった理由としては、ES細胞に極めて特異的に発現するという観点からは両者は同じであるものの、ECAT3はES細胞の維持や増殖にとっては必須ではないのに対し、ECAT5はES細胞の増殖を促進する因子であるため、その遺伝子量の減少 (ノックアウト) はES細胞化にとって不利になっていることが考えられた。

【実施例3】

【0144】

ECAT2遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT2遺伝子がES細胞で特異的に発現することは、既にノザンプロット解析により明らかになっている (WO 02/097090 号公報参照)。さらに詳細な発現解析をRT-PCRにより行ったところ、未分化ES細胞での特異的な発現が確認された (図3)。またサイクル数を増やすことにより精巣、および卵巣でも発現するが体組織では全く発現が認められなかつた (図3)。

【0145】

マウスECAT2ゲノム配列を、公的データベースであるMouse Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>) により同定した。このECAT2ゲノムを含有す

るBACクローンをPCRとサザンハイブリダイゼーションによりクローニングした。

ECAT2遺伝子をノックアウトするためにエクソン1～3を β geo（ β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）またはHygro（ハイグロマイシン耐性遺伝子）と置換するためのターゲッティングベクターを作製した。すなわち、マウスECAT2遺伝子のエクソン1～3をIRES (internal ribosome entry site)- β geoカセット若しくはIRES-Hygroカセットで置換するようにデザインしたターゲッティングベクターを作製した。

【0146】

具体的にはまず、マウスECAT2ゲノムの5' flanking領域～エクソン1の領域を含有するフラグメントと、エクソン3～3' flanking領域を含有するフラグメントを、それぞれ前記BACクローンを鑄型としたPCRにより増幅し、これらをそれぞれターゲッティングベクターの5'-アームおよび3'-アームとした。5'-アームはプライマー(CCGCGGAAAGTCAAGAGATTGGGT GG (配列番号：47)、GCGGCCGCCTTACGGGTACAGAGGGTCAC (配列番号：48))により増幅し、3'-アームはプライマー(TGTGGCCAGTGTGTTGGTCTGGCGGG (配列番号：49)、CTCGAGGACTCGC CATTCTAGCCAAG (配列番号：50))により増幅した。得られた2つの増幅断片をpBSSK(-)-IRES- β geoまたはpBSSK(-)-IRES-HygroのIRES- β geoカセット若しくはIRES-Hygroカセットにライゲーションすることによりターゲッティングベクターを完成し、これをSacIIで切断して直鎖化した。

前記ターゲッティングベクターによるECAT2遺伝子破壊の概略を図4に示す。

【0147】

直鎖化したターゲッティングベクターをエレクトロポレーションによりRF8ES細胞 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)) に導入し、各薬剤 (β geoの場合はネオマイシン (G418)、Hygroの場合はハイグロマイシン) により選択した。相同組み換えが正しく起こっていることの確認はサザンプロットにて行った。すなわち、前記ES細胞から抽出したゲノムDNAをPstIで切断後、電気泳動し、ナイロンメンブランへ転写した。これをECAT2遺伝子の3'領域のプローブとハイブリダイゼーションさせた。正常ゲノムからは18kbpのバンド、 β geoベクターとの相同組み換えでは13kbpのバンド、そしてHygroベクターとの相同組み換えでは9kbpのバンドが検出される。結果を図5に示す。各薬剤耐性ES細胞において相同組み換えが正しく起こっていることが確認された。

さらにHygroベクターとの相同組み換えES細胞に β geoベクターを導入し、ネオマイシンで選択したところ、両者で相同組み換えが起こった、すなわちECAT2遺伝子がホモ変異となったES細胞を3クローン得ることが出来た。 β geoベクターとHygroベクターの両者で正しく相同組み換えが起こっていることは前記と同様のサザンプロットにより確認した(図5)。またノザンプロットにより、これらのクローンはECAT2の発現が消失していることが確認できた(図6)。

【0148】

このホモ変異ES細胞がES細胞としての機能を保持しているかどうかを調べたところ、形態、増殖、分化能すべてが正常であった。以上の結果から、ECAT2はES細胞、精巣、卵巣に特異的に発現するが、ESの維持や初期発生には必須でない因子であることが分かった。従って、ECAT3遺伝子と同様にES細胞の選択に極めて有効に利用できることが明らかとなつた。

次に、 β geoとの相同組み換えES細胞をマウス (C57BL/6) のプラストシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウスを樹立した。さらにヘテロ変異マウス同士の交配から、ホモ変異マウスがメンデルの法則に従って誕生した。このホモ変異マウス由来の体細胞を用いて、実施例1と同様のプロトコールで実験を行うことにより、実施例1と同様にES細胞様コロニーを得ることができる。

すなわち、ECAT2 β geo/ β geoマウスの胸腺から常法によりリンパ球を採取し、実施例1と同様のプロトコールでこのリンパ球とES細胞(RF8細胞)とを融合し、G418で選択培養したところ、実施例1と同様に多数のES細胞様コロニーが得られた。従ってECAT2もECAT3と同様に核初期化因子のスクリーニング等に利用できることが分かった。

【実施例4】

【0149】

ECAT3 β geo/ β geoマウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT3 β geo/ β geoマウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

【実施例5】

【0150】

ECAT2 β geo/ β geoマウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT2 β geo/ β geoマウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

【実施例6】

【0151】

ECAT2^{Hygro/Hygro}・ECAT3 β geo/ β geoダブルノックインマウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT2^{Hygro/Hygro}・ECAT3 β geo/ β geoダブルノックインマウスはECAT2^{Hygro/Hygro}マウスとECAT3 β geo/ β geoマウスを交配させることにより得ることができる。このダブルノックインマウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p 14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件でフィーダー細胞（細胞名）上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にて薬剤選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

【実施例7】

【0152】

ECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞を用いたES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング

実施例3で作製したECAT2遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を、被験物質存在下、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)

))に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。

【実施例8】

【0153】

ECAT3遺伝子ホモ変異ES細胞を用いたES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング

実施例1で作製した β geoベクターとの相同組み換えES細胞に対して、さらにHygroベクター (ECAT3遺伝子をHygro遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベクター) を導入し、ECAT3遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を作製する。この細胞を、被験物質存在下、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。

【産業上の利用可能性】

【0154】

本発明により、体細胞核初期化物質の効率的なスクリーニング方法が提供される。核初期化物質は、幹細胞療法を現実化するために極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのような核初期化物質の早期発見が可能となる。さらに本発明により、ES細胞未分化・多能性維持物質の効率的なスクリーニング方法が提供される。ES細胞未分化・多能性維持物質はES細胞の臨床応用において極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのようなES細胞未分化・多能性維持物質の早期発見が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0155】

【図1】実施例1の概要を示した図である。ECAT3 β geo/ β geoマウスより単離したリンパ球と正常ES細胞とを融合し、G418で選択した結果、Oct3/4およびNanog(ECAT4)陽性のES様細胞が出現したことを示している。

【図2】ECAT3 β geo/ β geoマウスより単離したリンパ球と正常ES細胞とを融合し、G418で選択した細胞をフローサイトメトリー (FACS) で解析した結果を示す図である。融合前 (図中WT) と比べ、融合細胞 (図中Fusion) では、大きさ (FSC) は約2倍となり、DNA量 (PI) も4倍体となったことを示している。

【図3】ECAT2遺伝子の各種細胞・組織における発現をRT-PCRで解析した結果を示す図である。(A) はRT-PCRによる増幅サイクルを25回繰り返し結果を示し、また(B) は30回繰り返した結果を示す。ESG1はECAT2の結果を、NAT1はポジティブコントロールであるNAT1の結果を指す。各レーンは以下の細胞・組織におけるECAT2またはNAT1の発現を示す：レーン1：未分化MG1.19細胞、レーン2：分化MG1.19細胞、レーン3：RT-MG1.19細胞、レーン4：未分化RF-8細胞、レーン5：分化RF-8細胞、レーン6：RT-RF-8細胞、レーン7：脳、レーン8：心臓、レーン9：腎臓、レーン10：精

巢、レーン11：脾臓、レーン12：筋肉、レーン13：肺、レーン14：胃、レーン15：卵巣、レーン16：胸腺、レーン17：肝臓、レーン18：皮膚、レーン19：小腸。

【図4】ECAT2遺伝子を β geo（ β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）またはHygro（ハイグロマイシン耐性遺伝子）でノックインするためのターゲッティングベクターと、それを用いたECAT2遺伝子破壊の概念を示した図である。

【図5】ターゲッティングベクターをES細胞に導入して得られた薬剤耐性細胞において、相同組み換えが正しく起こっていることを確認したサザンプロット解析の図である。図中、WTはベクター導入のないES細胞の結果を示す。また図中、-/-（レーンNo. 27、35、36）は β geoベクターとHygroベクターの両者で相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞の結果を、 β -geo +/-（レーンNo. 78、30、32、33）は β geoベクターで相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ヘテロ変異ES細胞の結果を、またhygro +/-（レーン4、7、31、34）はHygroベクターで相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ヘテロ変異ES細胞の結果を、それぞれ示す。

【図6】 β geoベクターとHygroベクターの両者で相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞において、ECAT2遺伝子の発現が消失していることを確認したノザンプロット解析の図である。図中、各レーンの説明は図5と同じである。上図はノザンプロット解析の結果を示すオートラジオグラムであり、下図はリボゾーマルRNAをエチジウムブロマイド染色した写真を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0156】

配列番号：39に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：40に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：41に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：42に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：43に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：44に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：45に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：46に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：47に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：48に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：49に記載の塩基配列はプライマーである。
 配列番号：50に記載の塩基配列はプライマーである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanaka, Shinya
Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Screening method for substances which induce
nuclear reprogramming of somatic cells

<130> 133279

<150> JP 2004-042337

<151> 2004-02-19

<160> 50

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1623

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (50)..(1369)

<400> 1

tgactgatct	ttagtgcata	taggttcct	gcggtgaaac	gggtacact	atg	gcc	tct	58
					Met	Ala	Ser	
								1

ctg	aag	agg	ttt	cag	acg	ctc	gtg	ccc	ctg	gat	cac	aaa	caa	ggt	acc	106
Leu	Lys	Arg	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Pro	Leu	Asp	His	Lys	Gln	Gly	Thr	
5						10										15

tta	ttt	gaa	att	att	gga	gag	ccc	aag	ttg	ccc	aag	tgg	ttc	cat	gtc	154
Leu	Phe	Glu	Ile	Ile	Gly	Glu	Pro	Lys	Leu	Pro	Lys	Trp	Phe	His	Val	
20					25											35

gaa	tgc	ctg	gaa	gat	cca	aaa	aga	ctg	tac	gtg	gaa	cct	cgg	cta	ctg	202
Glu	Cys	Leu	Glu	Asp	Pro	Lys	Arg	Leu	Tyr	Val	Glu	Pro	Arg	Leu	Leu	
.								40		45						50

gaa	atc	atg	ttt	ggt	aag	gat	gga	gag	cac	atc	cca	cat	ctt	gaa	tct	250
Glu	Ile	Met	Phe	Gly	Lys	Asp	Gly	Glu	His	Ile	Pro	His	Leu	Glu	Ser	
								55		60						65

atg	ttg	cac	acc	ctg	ata	cat	gtg	aac	gtg	tgg	ggc	cct	gaa	agg	cga	298
Met	Leu	His	Thr	Leu	Ile	His	Val	Asn	Val	Trp	Gly	Pro	Glu	Arg	Arg	

70	75	80	
gct gag att tgg ata ttc gga ccg ccg cct ttc cga agg gac gtt gac Ala Glu Ile Trp Ile Phe Gly Pro Pro Pro Phe Arg Arg Asp Val Asp			346
85	90	95	
cgg atg ctc act gat ctg gct cac tat tgc cgc atg aaa ctg atg gaa Arg Met Leu Thr Asp Leu Ala His Tyr Cys Arg Met Lys Leu Met Glu			394
100	105	110	115
ata gag gct ctg gag gct gga gtt gag cgt cgt atg gcg gcc cat Ile Glu Ala Leu Glu Ala Gly Val Glu Arg Arg Met Ala Ala His			442
120	125	130	
aag gct gcc acc cag cct gct ccc gtg aag gtc cgc gag gct gcc cct Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro			490
135	140	145	
cgg ccc gct tcc gtg aag gtc cct gag acg gcc acc cag cct gct ccc Arg Pro Ala Ser Val Lys Val Pro Glu Thr Ala Thr Gln Pro Ala Pro			538
150	155	160	
gtg aag gtc cgc gag gct gcc cct cag ccc gct ccg gtg cag gag gtc Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Pro Ala Pro Val Gln Glu Val			586
165	170	175	
cgc gag gct gcc cct cag cag gct tcc gtg cag gag gag gtc cgc gag Arg Glu Ala Ala Pro Gln Gln Ala Ser Val Gln Glu Glu Val Arg Glu			634
180	185	190	195
gct gcc acc gag cag gct ccc gtg cag gag gtc cgc gag gct gcc acc Ala Ala Thr Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Arg Glu Ala Ala Thr			682
200	205	210	
gag cag gct ccc gtg cag gag gtc agc gag gct gcc acc gag cag gct Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Ser Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala			730
215	220	225	
ccc gtg cag gag gtc aac gag gct gcc acc gag cag gct tcc gtg cag Pro Val Gln Glu Val Asn Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala Ser Val Gln			778
230	235	240	
gcg gtc cgc gag gct gcc acc cgg ccg gct ccc ggg aag gtc cgc aag Ala Val Arg Glu Ala Ala Thr Arg Pro Ala Pro Gly Lys Val Arg Lys			826
245	250	255	
gcg gcc acc cag ccg gct ccg gtg cag gtt tgc cag gag gcc acc cag Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Gln Val Cys Gln Glu Ala Thr Gln			874
260	265	270	275

ttg gct ccc gtg aag gtc cgc gag gcg gcc acc cag ccg gct tcc ggg Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Pro Ala Ser Gly 280 285 290	922
aag gtc cgc gag gcg gcc acc cag ttg gct cct gtg aag gtc cgc aag Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Lys 295 300 305	970
gca gcc acc cag ttg gct cct gtg aag gtc cac gag gcg gcc acc cag Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val His Glu Ala Ala Thr Gln 310 315 320	1018
ccg gct ccg ggg aag gtc agc gat gct gcc acg cag tcg gct tcg gtg Pro Ala Pro Gly Lys Val Ser Asp Ala Ala Thr Gln Ser Ala Ser Val 325 330 335	1066
cag gtt cgt gag gct gcc acg cag ctg tct ccc gtg gag gcc act gat Gln Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ser Pro Val Glu Ala Thr Asp 340 345 350 355	1114
act agc cag ttg gct cag gtg aag gct gat gaa gcc ttt gcc cag cac Thr Ser Gln Leu Ala Gln Val Lys Ala Asp Glu Ala Phe Ala Gln His 360 365 370	1162
act tca ggg gag gcc cac cag gtt gcc aat ggg cag tct ccc att gaa Thr Ser Gly Glu Ala His Gln Val Ala Asn Gly Gln Ser Pro Ile Glu 375 380 385	1210
gtc tgt gag act gcc acc ggg cag cat tct cta gat gtc tct agg gcc Val Cys Glu Thr Ala Thr Gly Gln His Ser Leu Asp Val Ser Arg Ala 390 395 400	1258
ttg tcc cag aag tgt cct gag gtt ttt gag tgg gag acc cag agt tgt Leu Ser Gln Lys Cys Pro Glu Val Phe Glu Trp Glu Thr Gln Ser Cys 405 410 415	1306
ttg gat ggc agc tat gtc ata gtt cag cct cca agg gat gcc tgg gaa Leu Asp Gly Ser Tyr Val Ile Val Gln Pro Pro Arg Asp Ala Trp Glu 420 425 430 435	1354
tca ttt atc ata tta taaatgcatac tctgggtgtga gccaggatag atggcacacg Ser Phe Ile Ile Leu 440	1409
tctgcaaatac cagaacctaa aggtaggggt tagcttgggc tgagtaaggc aatgatctta	1469
aacctcagcc tgcctaagac tcccttcatac tttcttctg gttttgccccc taggaatcgg	1529
gaagaacaga gtagagctgt tttgtttcc ccattgtgtt aaatgtttgc agacacaatt	1589

taaagtattc taataaaaaa aaaattgcat tccc 1623

<210> 2
<211> 440
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2				
Met Ala Ser Leu Lys Arg Phe Gln Thr Leu Val Pro Leu Asp His Lys	1	5	10	15
Gln Gly Thr Leu Phe Glu Ile Ile Gly Glu Pro Lys Leu Pro Lys Trp	20	25	30	
Phe His Val Glu Cys Leu Glu Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Val Glu Pro	35	40	45	
Arg Leu Leu Glu Ile Met Phe Gly Lys Asp Gly Glu His Ile Pro His	50	55	60	
Leu Glu Ser Met Leu His Thr Leu Ile His Val Asn Val Trp Gly Pro	65	70	75	80
Glu Arg Arg Ala Glu Ile Trp Ile Phe Gly Pro Pro Pro Phe Arg Arg	85	90	95	
Asp Val Asp Arg Met Leu Thr Asp Leu Ala His Tyr Cys Arg Met Lys	100	105	110	
Leu Met Glu Ile Glu Ala Leu Glu Ala Gly Val Glu Arg Arg Arg Met	115	120	125	
Ala Ala His Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu	130	135	140	
Ala Ala Pro Arg Pro Ala Ser Val Lys Val Pro Glu Thr Ala Thr Gln	145	150	155	160
Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Pro Ala Pro Val	165	170	175	
Gln Glu Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Gln Ala Ser Val Gln Glu Glu	180	185	190	
Val Arg Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Arg Glu	195	200	205	
Ala Ala Thr Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Ser Glu Ala Ala Thr	210	215	220	

Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Asn Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala
 225 230 235 240
 Ser Val Gln Ala Val Arg Glu Ala Ala Thr Arg Pro Ala Pro Gly Lys
 245 250 255
 Val Arg Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Gln Val Cys Gln Glu
 260 265 270
 Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Pro
 275 280 285
 Ala Ser Gly Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys
 290 295 300
 Val Arg Lys Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val His Glu Ala
 305 310 315 320
 Ala Thr Gln Pro Ala Pro Gly Lys Val Ser Asp Ala Ala Thr Gln Ser
 325 330 335
 Ala Ser Val Gln Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ser Pro Val Glu
 340 345 350
 Ala Thr Asp Thr Ser Gln Leu Ala Gln Val Lys Ala Asp Glu Ala Phe
 355 360 365
 Ala Gln His Thr Ser Gly Glu Ala His Gln Val Ala Asn Gly Gln Ser
 370 375 380
 Pro Ile Glu Val Cys Glu Thr Ala Thr Gly Gln His Ser Leu Asp Val
 385 390 395 400
 Ser Arg Ala Leu Ser Gln Lys Cys Pro Glu Val Phe Glu Trp Glu Thr
 405 410 415
 Gln Ser Cys Leu Asp Gly Ser Tyr Val Ile Val Gln Pro Pro Arg Asp
 420 425 430
 Ala Trp Glu Ser Phe Ile Ile Leu
 435 440

<210> 3
 <211> 1063
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (54)..(704)

Val Gln Glu Val Gly Thr Gln Gly Ser Pro Val Glu Val Gln Glu Ala
 165 170 175
 ggg acc cag cag tct ctc cag gct gcc aac aag tcg ggg acc cag cga 632
 Gly Thr Gln Gln Ser Leu Gln Ala Ala Asn Lys Ser Gly Thr Gln Arg
 180 185 190
 tcc ccc gaa gct gcc agc aag gca gtg acc cag cggtt cgc gag gat 680
 Ser Pro Glu Ala Ala Ser Lys Ala Val Thr Gln Arg Phe Arg Glu Asp
 195 200 205
 gcc cgg gac cca gtt act aga tta tgaaggcatc tcaggccctg gagccagagc 734
 Ala Arg Asp Pro Val Thr Arg Leu
 210 215
 cagtcagggg tttaagtcaa agcccgattt tccgccaga agctgggtt ggggagagga 794
 tgtggatttt ttgtttacc ctttctgttg catggttgca aacacaaact ttagttctaa 854
 taaaatggaa caaatggaa gcccgc(ccccccccccc)ccgcctccct taagtccagg 914
 aagctgggtt ggccgaggaag gatgatgtgg attgttttg ttttaccctt tttgttgaat 974
 gttgccaac ccaaacttga gtttaataa ataattgcct ttccaaaaaa aaaaaaaaaa 1034
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1063

<210> 4
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Asp Ala Pro Arg Arg Phe Pro Thr Leu Val Gln Leu Met Gln Pro
 1 5 10 15
 Lys Ala Met Pro Val Glu Val Leu Gly His Leu Pro Lys Arg Phe Ser
 20 25 30

Trp Phe His Ser Glu Phe Leu Lys Asn Pro Lys Val Val Arg Leu Glu
 35 40 45

Val Trp Leu Val Glu Lys Ile Phe Gly Arg Gly Glu Arg Ile Pro
 50 55 60

His Val Gln Gly Met Ser Gln Ile Leu Ile His Val Asn Arg Leu Asp
 65 70 75 80

Pro Asn Gly Glu Ala Glu Ile Leu Val Phe Gly Arg Pro Ser Tyr Gln

85

90

95

Glu Asp Thr Ile Lys Met Ile Met Asn Leu Ala Asp Tyr His Arg Gln
 100 105 110

Leu Gln Ala Lys Gly Ser Gly Lys Ala Leu Ala Gln Asp Val Ala Thr
 115 120 125

Gln Lys Ala Glu Thr Gln Arg Ser Ser Ile Glu Val Arg Glu Ala Gly
 130 135 140

Thr Gln Arg Ser Val Glu Val Arg Glu Ala Gly Thr Gln Arg Ser Val
 145 150 155 160

Glu Val Gln Glu Val Gly Thr Gln Gly Ser Pro Val Glu Val Gln Glu
 165 170 175

Ala Gly Thr Gln Gln Ser Leu Gln Ala Ala Asn Lys Ser Gly Thr Gln
 180 185 190

Arg Ser Pro Glu Ala Ala Ser Lys Ala Val Thr Gln Arg Phe Arg Glu
 195 200 205

Asp Ala Arg Asp Pro Val Thr Arg Leu
 210 215

<210> 5

<211> 591

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(412)

<400> 5

gccgtgcgtg gtggataagc ttgatctcg tttccctgaa gtcgttgttcc ttggcagg 58

atg atg gtg acc ctc gtg acc cgt aaa gat atc ccc ccg tgg gtg aaa 106
 Met Met Val Thr Leu Val Thr Arg Lys Asp Ile Pro Pro Trp Val Lys
 1 5 10 15

gtt cct gaa gac ctg aaa gat cca gaa gta ttc cag gtc cag tcg ctg 154
 Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Ser Leu
 20 25 30

gtg ctg aaa tat ctg ttt ggc cca cag gga tct cga atg tct cac atc 202
 Val Leu Lys Tyr Leu Phe Gly Pro Gln Gly Ser Arg Met Ser His Ile

35	40	45	
gag cag gtg agc cag gcc atg ttt gag ctg aag aac ctg gaa tct ccc Glu Gln Val Ser Gln Ala Met Phe Glu Leu Lys Asn Leu Glu Ser Pro			250
50	55	60	
gaa gaa ctt atc gag gtc ttc att tac ggc tct caa aac aac aag att Glu Glu Leu Ile Glu Val Phe Ile Tyr Gly Ser Gln Asn Asn Lys Ile			298
65	70	75	80
cgg gct aaa tgg atg ctt cag tcc atg gct gag agg tac cac ctg cgc Arg Ala Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Arg Tyr His Leu Arg			346
85	90	95	
cag caa aaa gga gtg ctg aag ctg gag gaa tcc atg aag acc ctg gag Gln Gln Lys Gly Val Leu Lys Leu Glu Glu Ser Met Lys Thr Leu Glu			394
100	105	110	
cta ggc cag tgt atc gag tgaagccagt ttccagtcct tgtgtctccg Leu Gly Gln Cys Ile Glu			442
115			
acctggatgc aggttaagct gtggccagt tttggttctg gcgggatttt tagctttgtt 502			
acatccttagc aagatattct ggatccctgc tgccattct gatgtgaatc ccaaggttac 562			
cactctaaat aaaaaataaa attgaagt			591

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6			
Met Met Val Thr Leu Val Thr Arg Lys Asp Ile Pro Pro Trp Val Lys			
1	5	10	15
Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Ser Leu			
20	25	30	
Val Leu Lys Tyr Leu Phe Gly Pro Gln Gly Ser Arg Met Ser His Ile			
35	40	45	
Glu Gln Val Ser Gln Ala Met Phe Glu Leu Lys Asn Leu Glu Ser Pro			
50	55	60	
Glu Glu Leu Ile Glu Val Phe Ile Tyr Gly Ser Gln Asn Asn Lys Ile			
65	70	75	80

Arg Ala Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Arg Tyr His Leu Arg
 85 90 95
 Gln Gln Lys Gly Val Leu Lys Leu Glu Glu Ser Met Lys Thr Leu Glu
 100 105 110
 Leu Gly Gln Cys Ile Glu
 115

<210> 7
 <211> 640
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (15)..(362)

<400> 7
 ggcacgagga taag atg gga act ctc ccg gca cgt aga cat atc ccg ccg 50
 Met Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg His Ile Pro Pro
 1 5 10

tgg gtg aaa gtt ccc gaa gac ctg aaa gat cca gag gtg ttc cag gtc 98
 Trp Val Lys Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val
 15 20 25

cag acg cgg ctg ctg aaa gcc att ttc ggc ccg gac gga tct cga atc 146
 Gln Thr Arg Leu Leu Lys Ala Ile Phe Gly Pro Asp Gly Ser Arg Ile
 30 35 40

cct tac atc gag cag gtg agc aag gcc atg ctc gag ctg aag gct ctg 194
 Pro Tyr Ile Glu Gln Val Ser Lys Ala Met Leu Glu Leu Lys Ala Leu
 45 50 55 60

gag tct tca gac ctc acc gag gtc gtg gtt tac ggc tcc tat ttg tac 242
 Glu Ser Ser Asp Leu Thr Glu Val Val Val Tyr Gly Ser Tyr Leu Tyr
 65 70 75

aag ctc cgg acc aag tgg atg ctc cag tcc atg gct gag tgg cac cgc 290
 Lys Leu Arg Thr Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Trp His Arg
 80 85 90

cag cgc cag gag cga ggg atg ctc aaa ctt gcc gaa gcc atg aat gcc 338
 Gln Arg Gln Glu Arg Gly Met Leu Lys Leu Ala Glu Ala Met Asn Ala
 95 100 105

ctc gaa cta ggc cct tgg atg aag tgaaccagtt tccagccaat gcaatgaagc 392

Leu Glu Leu Gly Pro Trp Met Lys
110 115

cgggttgcag agattagggtt gtggccagag ctagagtat tccttaagct tttttaaaaa 452
tctgctccag cctaaagagt taaggaaaaa ccatttgttc ccttaaagag ttaaggaaaa 512
acccttgct ctgagtcggc ttgtgaatat ttcttgatg attgttaata aaaagtgtt 572
tttctttttt cccattttta aaaataacaa taaagttta aataagttga taaaaaaaaa 632
aaaaaaaaa 640

<210> 8
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Met Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg His Ile Pro Pro Trp Val Lys Val
1 5 10 15
Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Thr Arg Leu
20 25 30
Leu Lys Ala Ile Phe Gly Pro Asp Gly Ser Arg Ile Pro Tyr Ile Glu
35 40 45
Gln Val Ser Lys Ala Met Leu Glu Leu Lys Ala Leu Glu Ser Ser Asp
50 55 60
Leu Thr Glu Val Val Val Tyr Gly Ser Tyr Leu Tyr Lys Leu Arg Thr
65 70 75 80
Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Trp His Arg Gln Arg Gln Glu
85 90 95
Arg Gly Met Leu Lys Leu Ala Glu Ala Met Asn Ala Leu Glu Leu Gly
100 105 110
Pro Trp Met Lys
115

<210> 9
<211> 1670
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (134)..(1567)

<400> 9

acttgcctgt ccaagatctg ttggaatctg cttctacaga agaccagctg aaacaaatag 60

cttcgtggta ctgagcacaa ctactagatt ctggacttc cgttcacagc tgccaattgt 120

tgggagtaca ata atg gag gag tcg gaa ttg gag att ttt aga agt aag 169
Met Glu Glu Ser Glu Leu Glu Ile Phe Arg Ser Lys
1 5 10ttt gtt aga ggc tca tct gtc acg aag cag cat gcc tgg cga aac cag 217
Phe Val Arg Gly Ser Ser Val Thr Lys Gln His Ala Trp Arg Asn Gln
15 20 25cac agc gag aag cgt tgc tct tcc atc agt tct ata tcc ctg gac 265
His Ser Glu Lys Arg Cys Ser Ser Ile Ser Ser Ile Ser Leu Asp
30 35 40aga atg cca tcg gaa atc ttg gtg aag ata ctt tct tac ttg gat gcg 313
Arg Met Pro Ser Glu Ile Leu Val Lys Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala
45 50 55 60gtg acc ttg gtg tgc att gga tgt gtg agc aga cgc ttt tat cat ttg 361
Val Thr Leu Val Cys Ile Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu
65 70 75gct gat gac aat ctt att tgg gtc agg aag tac gca gct gca ttt aga 409
Ala Asp Asp Asn Leu Ile Trp Val Arg Lys Tyr Ala Ala Ala Phe Arg
80 85 90tca aaa aga tca cgt tgg aaa gct act tca gtg gag gaa aca gcc aca 457
Ser Lys Arg Ser Arg Trp Lys Ala Thr Ser Val Glu Glu Thr Ala Thr
95 100 105agt ctg agc ttg ctg tca gtt tgg gat aaa gaa gat gga tac tgg aag 505
Ser Leu Ser Leu Ser Val Trp Asp Lys Glu Asp Gly Tyr Trp Lys
110 115 120aaa gaa tat att aca aag cag atc tca tct gtg aga gca gcc ctc acc 553
Lys Glu Tyr Ile Thr Lys Gln Ile Ser Ser Val Arg Ala Ala Leu Thr
125 130 135 140aac agc ctc agt cct gtc aaa cgc cgc aca agc ctt cct tcg aaa acc 601
Asn Ser Leu Ser Pro Val Lys Arg Arg Thr Ser Leu Pro Ser Lys Thr
145 150 155

aaa gag tcc ctc aga ata tct ggc tta ggt tgg aca atc atc tta aga Lys Glu Ser Leu Arg Ile Ser Gly Leu Gly Trp Thr Ile Ile Leu Arg 160 165 170	649
gaa gcc agt ggc aaa gaa cac atc atg cag cat tcg aat ctt tcc gta Glu Ala Ser Gly Lys Glu His Ile Met Gln His Ser Asn Leu Ser Val 175 180 185	697
aat gac aac tct gtc act gtt ttt tgg cat gac aaa aat tgg cca cat Asn Asp Asn Ser Val Thr Val Phe Trp His Asp Lys Asn Trp Pro His 190 195 200	745
gta gac acg ttg tcc acc ctg gat ttg tat ggt gcc aca cca att ttt Val Asp Thr Leu Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Thr Pro Ile Phe 205 210 215 220	793
atg gag cag tat aaa ggc cct aac aca agt tgt cca cga tgg ctg tct Met Glu Gln Tyr Lys Gly Pro Asn Thr Ser Cys Pro Arg Trp Leu Ser 225 230 235	841
tta att gaa aag tac gat ctg agt aat tta cgc aag tct gct atg att Leu Ile Glu Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Arg Lys Ser Ala Met Ile 240 245 250	889
ggc tgc gac aga cat gtt cgg gta ttc tgt gta aat cct ggc ctc ctg Gly Cys Asp Arg His Val Arg Val Phe Cys Val Asn Pro Gly Leu Leu 255 260 265	937
gtg ggg ctg tgg cag gag aat ggt gga cta gct ttt gtc atg gca aat Val Gly Leu Trp Gln Glu Asn Gly Gly Leu Ala Phe Val Met Ala Asn 270 275 280	985
att cat tcc cat ggc ctt ttc gag aga agc ata atg ggc tca gac act Ile His Ser His Gly Leu Phe Glu Arg Ser Ile Met Gly Ser Asp Thr 285 290 295 300	1033
att ccc tat aca ttg cct ccc gac act aca ttt gtg gat aac tac cca Ile Pro Tyr Thr Leu Pro Pro Asp Thr Phe Val Asp Asn Tyr Pro 305 310 315	1081
gac tca atg acc ttt tat gga gat aaa ggc ttt cag ctg cat atc gac Asp Ser Met Thr Phe Tyr Gly Asp Lys Gly Phe Gln Leu His Ile Asp 320 325 330	1129
att cat ggc agt aag act tac ttc ctg tgt agc acc ttc cac aat ctc Ile His Gly Ser Lys Thr Tyr Phe Leu Cys Ser Thr Phe His Asn Leu 335 340 345	1177
ttc tgc agg aga gcg ggc att aac aat gga tat gtg aag ttc ttg atg Phe Cys Arg Arg Ala Gly Ile Asn Asn Gly Tyr Val Lys Phe Leu Met	1225

350	355	360	
ata aac tta aaa aat aac aga gaa cac cta cct ctt gtt gga aaa gtt Ile Asn Leu Lys Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Val Gly Lys Val			1273
365	370	375	380
ggc ctt gaa tgg aga act gac tgt tta aat ggc cgt att gag agt tgc Gly Leu Glu Trp Arg Thr Asp Cys Leu Asn Gly Arg Ile Glu Ser Cys			1321
385	390		395
att gta gtg gat atg acc ttg ctg gat gag gac aag aag ccc atc tgg Ile Val Val Asp Met Thr Leu Leu Asp Glu Asp Lys Lys Pro Ile Trp			1369
400	405		410
tat gtg agt tct cca gtg tgc ttg aga tct gcc tgc ctt cct gat ttc Tyr Val Ser Ser Pro Val Cys Leu Arg Ser Ala Cys Leu Pro Asp Phe			1417
415	420		425
ccg cag ccg gct tac tct ttc gag tac atg gac agc gta gga gga gtg Pro Gln Pro Ala Tyr Ser Phe Glu Tyr Met Asp Ser Val Gly Gly Val			1465
430	435		440
tgc gca gac cta ggg tgg ttt gaa aat acc gat gaa tac ttc att gtc Cys Ala Asp Leu Gly Trp Phe Glu Asn Thr Asp Glu Tyr Phe Ile Val			1513
445	450		455
460			
aga ctg gac att tac ctc agt gta gca aaa tta caa caa tgg ttt ggg Arg Leu Asp Ile Tyr Leu Ser Val Ala Lys Leu Gln Gln Trp Phe Gly			1561
465	470		475
agg caa taaatgctga gtttagcagta gggagtcttg ttattagtaa gctgtttgtt Arg Gln			1617
ttttacaact ttgttttat tgaaagttaa aataaagcat atttgtggta ttc			1670

<210> 10
<211> 478
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Met Glu Glu Ser Glu Leu Glu Ile Phe Arg Ser Lys Phe Val Arg Gly
1 5 10 15

Ser Ser Val Thr Lys Gln His Ala Trp Arg Asn Gln His Ser Glu Lys
20 25 30

Arg Cys Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile Ser Leu Asp Arg Met Pro Ser
35 40 45

Glu Ile Leu Val Lys Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Val Thr Leu Val
 50 55 60

Cys Ile Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu Ala Asp Asp Asn
 65 70 75 80

Leu Ile Trp Val Arg Lys Tyr Ala Ala Ala Phe Arg Ser Lys Arg Ser
 85 90 95

Arg Trp Lys Ala Thr Ser Val Glu Glu Thr Ala Thr Ser Leu Ser Leu
 100 105 110

Leu Ser Val Trp Asp Lys Glu Asp Gly Tyr Trp Lys Lys Glu Tyr Ile
 115 120 125

Thr Lys Gln Ile Ser Ser Val Arg Ala Ala Leu Thr Asn Ser Leu Ser
 130 135 140

Pro Val Lys Arg Arg Thr Ser Leu Pro Ser Lys Thr Lys Glu Ser Leu
 145 150 155 160

Arg Ile Ser Gly Leu Gly Trp Thr Ile Ile Leu Arg Glu Ala Ser Gly
 165 170 175

Lys Glu His Ile Met Gln His Ser Asn Leu Ser Val Asn Asp Asn Ser
 180 185 190

Val Thr Val Phe Trp His Asp Lys Asn Trp Pro His Val Asp Thr Leu
 195 200 205

Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Thr Pro Ile Phe Met Glu Gln Tyr
 210 215 220

Lys Gly Pro Asn Thr Ser Cys Pro Arg Trp Leu Ser Leu Ile Glu Lys
 225 230 235 240

Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Arg Lys Ser Ala Met Ile Gly Cys Asp Arg
 245 250 255

His Val Arg Val Phe Cys Val Asn Pro Gly Leu Leu Val Gly Leu Trp
 260 265 270

Gln Glu Asn Gly Gly Leu Ala Phe Val Met Ala Asn Ile His Ser His
 275 280 285

Gly Leu Phe Glu Arg Ser Ile Met Gly Ser Asp Thr Ile Pro Tyr Thr
 290 295 300

Leu Pro Pro Asp Thr Thr Phe Val Asp Asn Tyr Pro Asp Ser Met Thr

305	310	315	320
Phe Tyr Gly Asp Lys Gly Phe Gln Leu His Ile Asp Ile His Gly Ser			
325		330	335
Lys Thr Tyr Phe Leu Cys Ser Thr Phe His Asn Leu Phe Cys Arg Arg			
340		345	350
Ala Gly Ile Asn Asn Gly Tyr Val Lys Phe Leu Met Ile Asn Leu Lys			
355		360	365
Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Val Gly Lys Val Gly Leu Glu Trp			
370		375	380
Arg Thr Asp Cys Leu Asn Gly Arg Ile Glu Ser Cys Ile Val Val Asp			
385		390	395
Met Thr Leu Leu Asp Glu Asp Lys Lys Pro Ile Trp Tyr Val Ser Ser			
405		410	415
Pro Val Cys Leu Arg Ser Ala Cys Leu Pro Asp Phe Pro Gln Pro Ala			
420		425	430
Tyr Ser Phe Glu Tyr Met Asp Ser Val Gly Val Cys Ala Asp Leu			
435		440	445
Gly Trp Phe Glu Asn Thr Asp Glu Tyr Phe Ile Val Arg Leu Asp Ile			
450		455	460
Tyr Leu Ser Val Ala Lys Leu Gln Gln Trp Phe Gly Arg Gln			
465		470	475

<210> 11
 <211> 1665
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (21)..(1550)

<400> 11
 agggtgaact ccttgtctct atg gcg act gga cgc ggt cgg atc ttg cag cag 53
 Met Ala Thr Gly Arg Gly Arg Ile Leu Gln Gln
 1 5 10

cac tgg ctc ggc ctc cag acg ctg cgc ggg ccc agc agg ggc ggt ggc 101
 His Trp Leu Gly Leu Gln Thr Leu Arg Gly Pro Ser Arg Gly Gly

15	20	25	
gca gtc gtt ttt ggg ttt ggc aat aat ggt ggt			149
Ala Ala Arg Gly Arg Ala Arg Ala Phe Gly Cys Arg Lys Gly Pro Gly			
30	35	40	
gtc aat ctt tct gca ggc tct gct gcc ctg agg tgc cat gcc gga ggt			197
Val Lys Leu Ser Ala Gly Ser Ala Ala Leu Arg Cys His Ala Gly Gly			
45	50	55	
gga cag cac tgg gag agc tct ttc tcc tgc tgt tct ggg ttc ctg gat			245
Gly Gln His Trp Glu Ser Ser Phe Ser Cys Cys Ser Gly Phe Leu Asp			
60	65	70	75
gga atg cct tca gaa atc ttg ctg aag ata ttt tcc tac ttg gat gct			293
Gly Met Pro Ser Glu Ile Leu Leu Lys Ile Phe Ser Tyr Leu Asp Ala			
80	85	90	
gtg agc ctt ctg tgt act gga tgt gtg agc agg cgc ttt tat cat cta			341
Val Ser Leu Leu Cys Thr Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu			
95	100	105	
gcc aat gac aat ttt att tgg atc gga atc tac tca act gct ttt tca			389
Ala Asn Asp Asn Phe Ile Trp Ile Gly Ile Tyr Ser Thr Ala Phe Ser			
110	115	120	
cct gca aga tca aat tgg aaa ttt aat tca gta gag aag ata gct atg			437
Pro Ala Arg Ser Asn Trp Lys Phe Asn Ser Val Glu Lys Ile Ala Met			
125	130	135	
tct atg agc ttt ctg tca gtt cag gat aaa gaa gct ggt tat tgg aag			485
Ser Met Ser Phe Leu Ser Val Gln Asp Lys Glu Ala Gly Tyr Trp Lys			
140	145	150	155
aaa gaa tat atc aca aaa caa ata gca tct gta aaa gcc gca cta gct			533
Lys Glu Tyr Ile Thr Lys Gln Ile Ala Ser Val Lys Ala Ala Leu Ala			
160	165	170	
gac att ctc aaa cct gtc aac cct tac aca ggc ctt cca gtt aag acc			581
Asp Ile Leu Lys Pro Val Asn Pro Tyr Thr Gly Leu Pro Val Lys Thr			
175	180	185	
aaa gag gcc ctc aga ata ttt ggt tta ggt tgg gca att ata ctg aaa			629
Lys Glu Ala Leu Arg Ile Phe Gly Leu Gly Trp Ala Ile Ile Leu Lys			
190	195	200	
gaa aaa ggt gga aaa gaa tat atc atg gag cat gtt gat ctt tcc ata			677
Glu Lys Gly Gly Lys Glu Tyr Ile Met Glu His Val Asp Leu Ser Ile			
205	210	215	

aat gac aca tca gtt act gtt ata tgg tat ggc aaa aaa tgg cca tgc Asn Asp Thr Ser Val Thr Val Ile Trp Tyr Gly Lys Lys Trp Pro Cys 220 225 230 235	725
cta gca tca ttg tca acc tta gat tta tgt ggc atg aca cca gtt ttt Leu Ala Ser Leu Ser Thr Leu Asp Leu Cys Gly Met Thr Pro Val Phe 240 245 250	773
acc gac tgg tat aaa act ccc acc aaa cat aga ctc cga tgg cat tct Thr Asp Trp Tyr Lys Thr Pro His Arg Leu Arg Trp His Ser 255 260 265	821
tta att gca aag tac aat ctg agt cat ttg acc ata tct acc atg att Leu Ile Ala Lys Tyr Asn Leu Ser His Leu Thr Ile Ser Thr Met Ile 270 275 280	869
ggc tgt gac aga ctc att cggt atc ttc tgc ctg cac cct ggc ctc ctg Gly Cys Asp Arg Leu Ile Arg Ile Phe Cys Leu His Pro Gly Leu Leu 285 290 295	917
gtg gga gtg tgg aag aag gag gaa ctg gct ttt gtt atg gca aat Val Gly Val Trp Lys Lys Glu Glu Leu Ala Phe Val Met Ala Asn 300 305 310 315	965
ctt cat ttt cat cac ctt gtg gag agg agc aca tta ggc tcg gct act Leu His Phe His His Leu Val Glu Arg Ser Thr Leu Gly Ser Ala Thr 320 325 330	1013
atc ccc tat gaa ctg cct cca cat agc ccc ttt ttg gat gat agc ccc Ile Pro Tyr Glu Leu Pro Pro His Ser Pro Phe Leu Asp Asp Ser Pro 335 340 345	1061
gag tat gga ctg cac ggc tac caa ctc cat gtt gat ctg cac agc ggt Glu Tyr Gly Leu His Gly Tyr Gln Leu His Val Asp Leu His Ser Gly 350 355 360	1109
ggg gtt ttc tac cta tgt ggt aca ttt cgc aat ctc ttc acc aag aga Gly Val Phe Tyr Leu Cys Gly Thr Phe Arg Asn Leu Phe Thr Lys Arg 365 370 375	1157
gga aat att gaa aat gga cat gtg aag ctc att gtt ata cat tta aaa Gly Asn Ile Glu Asn Gly His Val Lys Leu Ile Val Ile His Leu Lys 380 385 390 395	1205
aat aac aga gaa cac cta cct ctt att gga aaa gtt ggc ctc tcg tgg Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Ile Gly Lys Val Gly Leu Ser Trp 400 405 410	1253
aaa act gat att ttt gat ggc tgt ata aag agt tgt tcc atg atg gac Lys Thr Asp Ile Phe Asp Gly Cys Ile Lys Ser Cys Ser Met Met Asp	1301

415	420	425	
gta act ctt ttg gat gaa cat ggg aaa ccc ttt tgg tgt ttc agt tcc Val Thr Leu Leu Asp Glu His Gly Lys Pro Phe Trp Cys Phe Ser Ser			1349
430	435	440	
ccg gtg tgc ctg aga tcg cct gcc aca ccc tct gac agc tct agc ttc Pro Val Cys Leu Arg Ser Pro Ala Thr Pro Ser Asp Ser Ser Phe			1397
445	450	455	
ttg gga cag aca tac aac gtg gac tac gtt gat gcg gaa gga aga gtg Leu Gly Gln Thr Tyr Asn Val Asp Tyr Val Asp Ala Glu Gly Arg Val			1445
460	465	470	475
cac gtg gag ctg gtg tgg atc aga gag acc gaa gaa tac ctt att gtc His Val Glu Leu Val Trp Ile Arg Glu Thr Glu Glu Tyr Leu Ile Val			1493
480	485	490	
aac ctg gtc ctt tat ctt agt atc gca aaa atc aac cat tgg ttt ggg Asn Leu Val Leu Tyr Leu Ser Ile Ala Lys Ile Asn His Trp Phe Gly			1541
495	500	505	
act gaa tat tagcagtagg tggcaaatta ttgttgttat ttagtgttt Thr Glu Tyr			1590
510			
attttgact ggcttggc ttgggtgtga aaattaaaaat aaagcaaatac tgcaaaaaaa			1650
aaaaaaaaaaa aaaaa			1665

<210> 12
<211> 510
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12			
Met Ala Thr Gly Arg Gly Arg Ile Leu Gln Gln His Trp Leu Gly Leu			
1	5	10	15
Gln Thr Leu Arg Gly Pro Ser Arg Gly Gly Ala Ala Arg Gly Arg			
20	25	30	
Ala Arg Ala Phe Gly Cys Arg Lys Gly Pro Gly Val Lys Leu Ser Ala			
35	40	45	
Gly Ser Ala Ala Leu Arg Cys His Ala Gly Gly Gln His Trp Glu			
50	55	60	
Ser Ser Phe Ser Cys Cys Ser Gly Phe Leu Asp Gly Met Pro Ser Glu			

65	70	75	80
Ile Leu Leu Lys Ile Phe Ser Tyr Leu Asp Ala Val Ser Leu Leu Cys			
85		90	95
Thr Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu Ala Asn Asn Asn Phe			
100		105	110
Ile Trp Ile Gly Ile Tyr Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ala Arg Ser Asn			
115		120	125
Trp Lys Phe Asn Ser Val Glu Lys Ile Ala Met Ser Met Ser Phe Leu			
130		135	140
Ser Val Gln Asp Lys Glu Ala Gly Tyr Trp Lys Lys Glu Tyr Ile Thr			
145		150	155
Lys Gln Ile Ala Ser Val Lys Ala Ala Leu Ala Asp Ile Leu Lys Pro			
165		170	175
Val Asn Pro Tyr Thr Gly Leu Pro Val Lys Thr Lys Glu Ala Leu Arg			
180		185	190
Ile Phe Gly Leu Gly Trp Ala Ile Ile Leu Lys Glu Lys Gly Gly Lys			
195		200	205
Glu Tyr Ile Met Glu His Val Asp Leu Ser Ile Asn Asp Thr Ser Val			
210		215	220
Thr Val Ile Trp Tyr Gly Lys Trp Pro Cys Leu Ala Ser Leu Ser			
225		230	235
240			
Thr Leu Asp Leu Cys Gly Met Thr Pro Val Phe Thr Asp Trp Tyr Lys			
245		250	255
Thr Pro Thr Lys His Arg Leu Arg Trp His Ser Leu Ile Ala Lys Tyr			
260		265	270
Asn Leu Ser His Leu Thr Ile Ser Thr Met Ile Gly Cys Asp Arg Leu			
275		280	285
Ile Arg Ile Phe Cys Leu His Pro Gly Leu Leu Val Gly Val Trp Lys			
290		295	300
Lys Glu Glu Glu Leu Ala Phe Val Met Ala Asn Leu His Phe His His			
305		310	315
Leu Val Glu Arg Ser Thr Leu Gly Ser Ala Thr Ile Pro Tyr Glu Leu			
325		330	335

Pro Pro His Ser Pro Phe Leu Asp Asp Ser Pro Glu Tyr Gly Leu His
 340 345 350

Gly Tyr Gln Leu His Val Asp Leu His Ser Gly Gly Val Phe Tyr Leu
 355 360 365

Cys Gly Thr Phe Arg Asn Leu Phe Thr Lys Arg Gly Asn Ile Glu Asn
 370 375 380

Gly His Val Lys Leu Ile Val Ile His Leu Lys Asn Asn Arg Glu His
 385 390 395 400

Leu Pro Leu Ile Gly Lys Val Gly Leu Ser Trp Lys Thr Asp Ile Phe
 405 410 415

Asp Gly Cys Ile Lys Ser Cys Ser Met Met Asp Val Thr Leu Leu Asp
 420 425 430

Glu His Gly Lys Pro Phe Trp Cys Phe Ser Ser Pro Val Cys Leu Arg
 435 440 445

Ser Pro Ala Thr Pro Ser Asp Ser Ser Ser Phe Leu Gly Gln Thr Tyr
 450 455 460

Asn Val Asp Tyr Val Asp Ala Glu Gly Arg Val His Val Glu Leu Val
 465 470 475 480

Trp Ile Arg Glu Thr Glu Glu Tyr Leu Ile Val Asn Leu Val Leu Tyr
 485 490 495

Leu Ser Ile Ala Lys Ile Asn His Trp Phe Gly Thr Glu Tyr
 500 505 510

<210> 13

<211> 2184

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (190)..(1104)

<400> 13

agaaaaggctg atttggttgg tgtcttgctc tttctgtggg aaggctgcgg ctcacttcct 60

tccgacttct tgataatttt gcattagaca tttaactctt ctttctatga tctttccctc 120

tagacactga gtttttggt tggcctaa aacctttca gaaatccctt ccctcgccat 180

cacactgac atg agt gtg ggt ctt cct ggt ccc cac agt ttg cct agt tct 231
 Met Ser Val Gly Leu Pro Gly Pro His Ser Leu Pro Ser Ser
 1 5 10

gag gaa gca tcg aat tct ggg aac gcc tca tca atg cct gca gtt ttt 279
 Glu Glu Ala Ser Asn Ser Gly Asn Ala Ser Ser Met Pro Ala Val Phe
 15 20 25 30

cat ccc gag aac tat tct tgc tta caa ggg tct gct act gag atg ctc 327
 His Pro Glu Asn Tyr Ser Cys Leu Gln Gly Ser Ala Thr Glu Met Leu
 35 40 45

tgc aca gag gct gcc tct cct cgc cct tcc tct gaa gac ctg cct ctt 375
 Cys Thr Glu Ala Ala Ser Pro Arg Pro Ser Ser Glu Asp Leu Pro Leu
 50 55 60

caa ggc agc cct gat tct tct acc agt ccc aaa caa aag ctc tca agt 423
 Gln Gly Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gln Lys Leu Ser Ser
 65 70 75

cct gag gct gac aag ggc cct gag gag gag aac aag gtc ctt gcc 471
 Pro Glu Ala Asp Lys Gly Pro Glu Glu Glu Asn Lys Val Leu Ala
 80 85 90

agg aag cag aag atg cgg act gtg ttc tct cag gcc cag ctg tgt gca 519
 Arg Lys Gln Lys Met Arg Thr Val Phe Ser Gln Ala Gln Leu Cys Ala
 95 100 105 110

ctc aag gac agg ttt cag aag cag aag tac ctc agc ctc cag cag atg 567
 Leu Lys Asp Arg Phe Gln Lys Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met
 115 120 125

caa gaa ctc tcc tcc att ctg aac ctg agc tat aag cag gtt aag acc 615
 Gln Glu Leu Ser Ser Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr
 130 135 140

tgg ttt caa aac caa agg gtg aag tgc aag cgg tgg cag aaa aac cag 663
 Trp Phe Gln Asn Gln Arg Val Lys Cys Lys Arg Trp Gln Lys Asn Gln
 145 150 155

tgg ttg aag act agc aat ggt ctg att cag aag ggc tca gca cca gtg 711
 Trp Leu Lys Thr Ser Asn Gly Leu Ile Gln Lys Gly Ser Ala Pro Val
 160 165 170

gag tat ccc agc atc cat tgc agc tat ccc cag ggc tat ctg gtg aac 759
 Glu Tyr Pro Ser Ile His Cys Ser Tyr Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn
 175 180 185 190

gca tct gga agc ctt tcc atg tgg ggc agc cag act tgg acc aac cca 807

Ala Ser Gly Ser Leu Ser Met Trp Gly Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro			
195	200	205	
act tgg agc agc cag acc tgg acc aac cca act tgg aac aac cag acc			855
Thr Trp Ser Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp Asn Asn Gln Thr			
210	215	220	
tgg acc aac cca act tgg agc cag gcc tgg acc gct cag tcc tgg			903
Trp Thr Asn Pro Thr Trp Ser Ser Gln Ala Trp Thr Ala Gln Ser Trp			
225	230	235	
aac ggc cag cct tgg aat gct gct ccg ctc cat aac ttc ggg gag gac			951
Asn Gly Gln Pro Trp Asn Ala Ala Pro Leu His Asn Phe Gly Glu Asp			
240	245	250	
ttt ctg cag cct tac gta cag ttg cag caa aac ttc tct gcc agt gat			999
Phe Leu Gln Pro Tyr Val Gln Leu Gln Gln Asn Phe Ser Ala Ser Asp			
255	260	265	270
ttg gag gtg aat ttg gaa gcc act agg gaa agc cat gcg cat ttt agc			1047
Leu Glu Val Asn Leu Glu Ala Thr Arg Glu Ser His Ala His Phe Ser			
275	280	285	
acc cca caa gcc ttg gaa tta ttc ctg aac tac tct gtg act cca cca			1095
Thr Pro Gln Ala Leu Glu Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Val Thr Pro Pro			
290	295	300	
ggt gaa ata tgagacttac gcaacatctg ggcttaaagt caggccaag			1144
Gly Glu Ile			
305			
ccaggttcct tccttcttcc aaatatttc atattttt taaagattt tttatttattt			1204
atatgttaagt acactgttagc tgtcttcaga cactccagaa gagggcgtca gatcttgtt			1264
cgtatggtttg tgagccacca tgtggttgct gggatttggaa ctcctgacct tcggaaagagc			1324
agtcgggtgc tcttatccac tgagccatct caccagcccc tggtttattt tttaatttat			1384
tatttgcttt ttgttatca agacagggtt tctctgcata gctctaattt tctttgaact			1444
agctctgcag accagcctgg ccttgaactc agagatctgc ccacttatct ttgcctcctg			1504
aatgctggga ccaaagggtgg cataccacca cacctggcat atatattgtt tatttctatt			1564
tctatttta ttgggccag agcaaaccctt ggacttagaa catgctggc accaactcaa			1624
cttctgagct ctatttacaa cttgggtgt tagtgtattt gtcttagttc tgaatttgtc			1684
cttttttag tgttaactct aggcttgga gacagtgagg tgcatatact ctctccttcc			1744

caagaataag tgcttgaaca cccttaccca cgcccaccca cccatgctag tctttttct 1804
 tagaagcgtg ggtcttgta tacactgtgt catttgagg ggtgaggttt aaaagtatat 1864
 acaaagtata acgatatggc ggctactctc gaggatgaga cagaaggacc aggagttga 1924
 ggttagctca gatatgcaat aagttcaagg ccaacctgta ctatgttaa atagtaagac 1984
 agcatctcgta taaaataata aaactaaagt ctcaacaaaa taaaagctt cacctattaa 2044
 ggtgcttgct tgccttgaa gtccccaaag agtaactgct atgttaatat ctgttagaaag 2104
 atgttatat ttgactgtac catgatgaac cgatgccagc tggactagtt taaacaaaaat 2164
 aaaacactaa ttttacctt 2184

<210> 14
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14
 Met Ser Val Gly Leu Pro Gly Pro His Ser Leu Pro Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15

Ala Ser Asn Ser Gly Asn Ala Ser Ser Met Pro Ala Val Phe His Pro
 20 25 30

Glu Asn Tyr Ser Cys Leu Gln Gly Ser Ala Thr Glu Met Leu Cys Thr
 35 40 45

Glu Ala Ala Ser Pro Arg Pro Ser Ser Glu Asp Leu Pro Leu Gln Gly
 50 55 60

Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gln Lys Leu Ser Ser Pro Glu
 65 70 75 80

Ala Asp Lys Gly Pro Glu Glu Glu Asn Lys Val Leu Ala Arg Lys
 85 90 95

Gln Lys Met Arg Thr Val Phe Ser Gln Ala Gln Leu Cys Ala Leu Lys
 100 105 110

Asp Arg Phe Gln Lys Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu
 115 120 125

Leu Ser Ser Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe
 130 135 140

Gln Asn Gln Arg Val Lys Cys Lys Arg Trp Gln Lys Asn Gln Trp Leu
 145 150 155 160

Lys Thr Ser Asn Gly Leu Ile Gln Lys Gly Ser Ala Pro Val Glu Tyr
 165 170 175

Pro Ser Ile His Cys Ser Tyr Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn Ala Ser
 180 185 190

Gly Ser Leu Ser Met Trp Gly Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp
 195 200 205

Ser Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp Asn Asn Gln Thr Trp Thr
 210 215 220

Asn Pro Thr Trp Ser Ser Gln Ala Trp Thr Ala Gln Ser Trp Asn Gly
 225 230 235 240

Gln Pro Trp Asn Ala Ala Pro Leu His Asn Phe Gly Glu Asp Phe Leu
 245 250 255

Gln Pro Tyr Val Gln Leu Gln Asn Phe Ser Ala Ser Asp Leu Glu
 260 265 270

Val Asn Leu Glu Ala Thr Arg Glu Ser His Ala His Phe Ser Thr Pro
 275 280 285

Gln Ala Leu Glu Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Val Thr Pro Pro Gly Glu
 290 295 300

Ile
305

<210> 15
 <211> 2114
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (217)..(1131)

<400> 15
 attataaattc tagagactcc aggattttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat 60
 gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat acttttcctt ctggagggtcc 120

tat	tttctcta	acatcttcca	gaaaagtctt	aaagctgcct	taacc	tttt	tcc	agg	tccac	180						
ctc	tttaattt	tttcctcct	cttcctctat	actaac	atg	agt	gtg	gat	cca	gct	234					
					Met	Ser	Val	Asp	Pro	Ala						
					1				5							
tgt	ccc	caa	agc	ttg	cct	tgc	ttt	gaa	gca	tcc	gac	tgt	aaa	gaa	tct	282
Cys	Pro	Gln	Ser	Leu	Pro	Cys	Phe	Glu	Ala	Ser	Asp	Cys	Lys	Glu	Ser	
	10				15				20							
tca	cct	atg	cct	gtg	att	tgt	ggg	cct	gaa	gaa	aac	tat	cca	tcc	ttg	330
Ser	Pro	Met	Pro	Val	Ile	Cys	Gly	Pro	Glu	Glu	Asn	Tyr	Pro	Ser	Leu	
	25			30				35								
caa	atg	tct	tct	gct	gag	atg	cct	cac	acg	gag	act	gtc	tct	cct	ctt	378
Gln	Met	Ser	Ser	Ala	Glu	Met	Pro	His	Thr	Glu	Thr	Val	Ser	Pro	Leu	
	40			45			50									
ccc	tcc	tcc	atg	ctg	ctt	att	cag	gac	agc	cct	gat	tct	tcc	acc	426	
Pro	Ser	Ser	Met	Asp	Leu	Ile	Gln	Asp	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr		
	55			60			65			70						
agt	ccc	aaa	ggc	aaa	caa	ccc	act	tct	gca	gag	aat	agt	gtc	gca	aaa	474
Ser	Pro	Lys	Gly	Lys	Gln	Pro	Thr	Ser	Ala	Glu	Asn	Ser	Val	Ala	Lys	
	75			80				85								
aag	gaa	gac	aag	gtc	cca	gtc	aag	aaa	cag	aag	acc	aga	act	gtg	ttc	522
Lys	Glu	Asp	Lys	Val	Pro	Val	Lys	Lys	Gln	Lys	Thr	Arg	Thr	Val	Phe	
	90			95				100								
tct	tcc	acc	cag	ctg	tgt	gta	ctc	aat	gat	aga	ttt	cag	aga	cag	aaa	570
Ser	Ser	Thr	Gln	Leu	Cys	Val	Leu	Asn	Asp	Arg	Phe	Gln	Arg	Gln	Lys	
	105			110			115									
tac	ctc	agc	ctc	cag	cag	atg	caa	gaa	ctc	tcc	aac	atc	ctg	aac	ctc	618
Tyr	Leu	Ser	Leu	Gln	Gln	Met	Gln	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile	Leu	Asn	Leu	
	120			125			130									
agc	tac	aaa	cag	gtg	aag	acc	tgg	ttc	cag	aac	cag	aga	atg	aaa	tct	666
Ser	Tyr	Lys	Gln	Val	Lys	Thr	Trp	Phe	Gln	Asn	Gln	Arg	Met	Lys	Ser	
	135			140			145			150						
aag	agg	tgg	cag	aaa	aac	aac	tgg	ccg	aag	aat	agc	aat	ggt	gtg	acg	714
Lys	Arg	Trp	Gln	Lys	Asn	Asn	Trp	Pro	Lys	Asn	Ser	Asn	Gly	Val	Thr	
	155			160			165									
cag	aag	gcc	tca	gca	cct	acc	tac	ccc	agc	ctc	tac	tct	tcc	tac	cac	762
Gln	Lys	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Tyr	Pro	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ser	Tyr	His	
	170			175			180									

cag gga tgc ctg gtg aac ccg act ggg aac ctt cca atg tgg agc aac Gln Gly Cys Leu Val Asn Pro Thr Gly Asn Leu Pro Met Trp Ser Asn 185 190 195	810
cag acc tgg aac aat tca acc tgg agc aac cag acc cag aac atc cag Gln Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Ser Asn Gln Thr Gln Asn Ile Gln 200 205 210	858
tcc tgg agc aac cac tcc tgg aac act cag acc tgg tgc acc caa tcc Ser Trp Ser Asn His Ser Trp Asn Thr Gln Thr Trp Cys Thr Gln Ser 215 220 225 230	906
tgg aac aat cag gcc tgg aac agt ccc ttc tat aac tgt gga gag gaa Trp Asn Asn Gln Ala Trp Asn Ser Pro Phe Tyr Asn Cys Gly Glu Glu 235 240 245	954
tct ctg cag tcc tgc atg cag ttc cag cca aat tct cct gcc agt gac Ser Leu Gln Ser Cys Met Gln Phe Gln Pro Asn Ser Pro Ala Ser Asp 250 255 260	1002
ttg gag gct ttg gaa gct gct ggg gaa ggc ctt aat gta ata cag Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu Gly Leu Asn Val Ile Gln 265 270 275	1050
cag acc act agg tat ttt agt act cca caa acc atg gat tta ttc cta Gln Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln Thr Met Asp Leu Phe Leu 280 285 290	1098
aac tac tcc atg aac atg caa cct gaa gac gtg tgaagatgag tgaaaactgat 1151 Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp Val 295 300 305	
attactcaat ttcatgtctgg acactggctg aatccttcct ctccccctc cccatccctc 1211	
ataggatttt tcttgtttgg aaaccacgtg ttctgggttc catgatgcct atccagtcaa 1271	
tctcatggag ggtggagtagt ggttgagacc taatcagcga ggtttctttt ttttttttc 1331	
ctattggatc ttccctggaga aaatactttt tttttttttt ttgagacgga gtcttgctct 1391	
gtcgcccagg ctggagtgca gtggcgccgt cttggctcac tgcaagctcc gcctcccg 1451	
ttcacgcccattt ttccttcctt cagcctcccg agcagctggg actacaggcg cccgccacct 1511	
cggccggcta atattttgtta ttttttagtag agacagggtt tcactgtgtt agccaggatg 1571	
gtctcgatct cctgacccttg tgatccggcc gcctcgccct ccctaacagc tgggattaca 1631	
ggcgtgagcc accgcgcctt gccttagaaaa gacatttaa taaccttggc tgctaaggac 1691	

aacattgata gaagccgtct ctggctatag ataagttagat ctaatactag tttggatatc 1751
ttttagggttt agaatctaac ctcaagaata agaaaataca gtacgaattg gtgatgaaga 1811
tgtattcgta ttgtttggga ttggaggct ttgcttattt ttttaaaact attgaggtaa 1871
agggttaagc tgtaacatac ttaattgatt tcctaccgtt ttggctctg tttgctata 1931
tcccctaatt tggtgggtgt gctaattttt gtagaaagag gtcttgatt tgctgcattcg 1991
taatgacatg agtactactt tagttggttt aagttcaaat gaatgaaaca aatattttc 2051
cttttagttga ttttaccctg atttcaccga gtgtttcgat gagtaaatat acagcttaaa 2111
cat 2114

<210> 16
<211> 305
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Met Ser Val Asp Pro Ala Cys Pro Gln Ser Leu Pro Cys Phe Glu Ala
1 5 10 15

Ser Asp Cys Lys Glu Ser Ser Pro Met Pro Val Ile Cys Gly Pro Glu
 20 25 30

Glu Asn Tyr Pro Ser Leu Gln Met Ser Ser Ala Glu Met Pro His Thr
35 40 45

Glu Thr Val Ser Pro Leu Pro Ser Ser Met Asp Leu Leu Ile Gln Asp
 50 55 60

Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gly Lys Gln Pro Thr Ser Ala
65 70 75 80

Glu Asn Ser Val Ala Lys Lys Glu Asp Lys Val Pro Val Lys Lys Gln
85 90 95

Lys Thr Arg Thr Val Phe Ser Ser Thr Gln Leu Cys Val Leu Asn Asp
 100 105 110

Arg Phe Gln Arg Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu Leu
 115 120 125

Ser Asn Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe Gln
 130 135 140

Asn Gln Arg Met Lys Ser Lys Arg Trp Gln Lys Asn Asn Trp Pro Lys
145 150 155 160

Asn Ser Asn Gly Val Thr Gln Lys Ala Ser Ala Pro Thr Tyr Pro Ser
165 170 175

Leu Tyr Ser Ser Tyr His Gln Gly Cys Leu Val Asn Pro Thr Gly Asn
180 185 190

Leu Pro Met Trp Ser Asn Gln Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Ser Asn
195 200 205

Gln Thr Gln Asn Ile Gln Ser Trp Ser Asn His Ser Trp Asn Thr Gln
210 215 220

Thr Trp Cys Thr Gln Ser Trp Asn Asn Gln Ala Trp Asn Ser Pro Phe
225 230 235 240

Tyr Asn Cys Gly Glu Glu Ser Leu Gln Ser Cys Met Gln Phe Gln Pro
245 250 255

Asn Ser Pro Ala Ser Asp Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu
260 265 270

Gly Leu Asn Val Ile Gln Gln Thr Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln
275 280 285

Thr Met Asp Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp
290 295 300

Val
305

<210> 17

<211> 1078

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (178)..(858)

<400> 17

caggggtcgg gcaggtggga ggggaaagct cacatctccg ccctctgctg cctctggggg 60

tagggagcat cctaaccccc aactgtccgg tcagatccgc ctactcccc tcatacgact 120

gctactcctg ggagcacacgc acctgcttt tacaccttt ccttgagctg ctgggga 177

atg gct ttg cct aca aag tct agc atc ttg gac ctg agc tcc ggc acc Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr	1 5 10 15	225
cca tgc acc aga tct cca gag gaa agt cac gag gct tgg gca cag tgc Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys	20 25 30	273
aaa gat gct ggc agg cag cta ccc gag tac aag gca gtg gtg ggt Lys Asp Ala Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly	35 40 45	321
gca agt ggt gtt ggt aaa agt gct ctc acc atc cag atg act cac caa Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln	50 55 60	369
tgc ttc gtg aaa gac cat gac ccc act atc caa gat tcc tac tgg aag Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys	65 70 75 80	417
gaa gtg gcc agg gac aac gga ggc tac att cta aat gtt ctg gat aca Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr	85 90 95	465
tct ggg cag gat att cac cgg gct ctg cgt gac cag tgc ttg gca tct Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser	100 105 110	513
ggt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttt gct ctt gac gac ccc tcg tct ctg Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu	115 120 125	561
gac cag ttg cag cag ata tgg tcc acc tgg acc cct cac cac aag cag Asp Gln Leu Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln	130 135 140	609
cct ctg gta cta gtg ggc aac aag tgt gac ctg gtg acc act gct gga Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly	145 150 155 160	657
gat gct cat gct gcc gca gcc ctc ctt gct cac aag ttg ggg gcc ccc Asp Ala His Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro	165 170 175	705
ttg gtg aag acc tca gcc aag acg cgg caa ggt gtg gag gaa gcc ttt Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe	180 185 190	753
gcc ctg ctt gtc cat gag att cag agg gcc cag gag gct gtg gcc gaa	801	

Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu
 195 200 205

tca agc aag aag acc cga cac cag aaa gcc gtg tgt agc tgt ggc tgc 849
 Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys
 210 215 220

tct gta gcc tgaagatctt tgtcttagcaa attgaccctt gtctcatgtc 898
 Ser Val Ala
 225

aaggtagacaa ttctttgtataaataagatctc ccttcggac caagttacca cagacatctt 958
 tttattgtca tttggtgaga agttacgtgg taacatggga catccctcat tgactgtgtt 1018
 ttatgaaact ctatgcaaaa ttaaataaat gtttcagga ttcaaagctt cctttataacc 1078

<210> 18
<211> 227
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 18
Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys
 20 25 30

Lys Asp Ala Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly
 35 40 45

Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln
 50 55 60

Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys
 65 70 75 80

Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr
 85 90 95

Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser
 100 105 110

Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu
 115 120 125

Asp Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln
 130 135 140

Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly
 145 150 155 160
 Asp Ala His Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro
 165 170 175
 Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe
 180 185 190
 Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu
 195 200 205
 Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys
 210 215 220
 Ser Val Ala
 225

<210> 19
 <211> 1266
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (252)..(950)

<400> 19
 cgtgaggagg gaaggagaga tggggggacg tggcacaggg agaaaacaac ataaatcata 60
 tatatatagc atgcaaatttgaaggtgtatc agcacacaat aggcatcaat taaatgttga 120
 aataatgaca cccactgtc tcctgcctt caaatggctt cccctaacctt atcccctttt 180
 gtcttgcttc ttctttcccc acttgcagag cctgctgccc acgtcttttc cctgagctgc 240
 ctgctgggtt c atg gag ctg cca aca aag cct ggc acc ttc gac ctg ggc 290
 Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly
 1 5 10

ctg gcc aca tgg agc cct tcc ttc cag ggg gaa acc cac cgg gct cag 338
 Leu Ala Thr Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln
 15 20 25

gca cgc cgc agg gat gtt ggc agg cag ctg cct gag tac aag gct gtg 386
 Ala Arg Arg Arg Asp Val Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val
 30 35 40 45

gtg gtg ggc gcc agt ggc gtg ggc aag agt gcg ctg acc atc cag ctg Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu	50	55	60	434
aac cac cag tgc ttc gtg gag gac cac gac ccc acc atc cag gat tcc Asn His Gln Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser	65	70	75	482
tac tgg aag gag ttg acc ctg gac agt ggg gac tgc att ctg aat gtg Tyr Trp Lys Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val	80	85	90	530
ctg gac aca gca ggg cag gcc atc cat agg gcc ctg cgt gac cag tgc Leu Asp Thr Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys	95	100	105	578
ctg gct gtc tgt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttc gct ctc gat gac ccc Leu Ala Val Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro	110	115	120	626
tcg tct ctg atc cag ctg cag cag ata tgg gcc acc tgg ggc cct cac Ser Ser Leu Ile Gln Leu Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His	130	135	140	674
ccc gcc cag ccc ctt gtc ctc gtg ggc aac aag tgt gac ctt gtg acc Pro Ala Gln Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr	145	150	155	722
act gct gga gat gct cat gcc gct gct gca gcc ctc gca cac agc tgg Thr Ala Gly Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp	160	165	170	770
ggg gcc cac ttc gtg gag acc tcg gcc aaa aca cgg caa ggc gtg gag Gly Ala His Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu	175	180	185	818
gag gcc ttt tcc ctg ctg gtc cat gag atc cag agg gtc cag gag gcc Glu Ala Phe Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala	190	195	200	866
atg gcg aag gag ccc atg gca agg tcc tgt agg gag aag acc cgg cac Met Ala Lys Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His	210	215	220	914
cag aag gcc acc tgc cac tgt ggc tgc tct gtg gcc tgaaggctt Gln Lys Ala Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala	225	230		960
ggccaagaaa tgtagacctt tccccaggcc agggtgattt ttcatttgac atgagacccc 1020				

tgaggcaact agctttgagg gacacatcg gtatactagg gaaagatgga catctctt 1080
 gtttcactt ggtgagggc ttttggtaa catggagtg cctaatttg ctttgttat 1140
 gtcaagttga aagatttgt gcaaaaattaa ataaatggtg ttttgggtt caaagctgcc 1200
 tccatgccga gtgttgtgtg ggtggagtg agactggta gaatgttact tgagttgtga 1260
 gaattc 1266

<210> 20
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Leu Ala Thr
 1 5 10 15

Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln Ala Arg Arg
 20 25 30

Arg Asp Val Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly
 35 40 45

Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Asn His Gln
 50 55 60

Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys
 65 70 75 80

Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr
 85 90 95

Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Val
 100 105 110

Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu
 115 120 125

Ile Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His Pro Ala Gln
 130 135 140

Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly
 145 150 155 160

Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp Gly Ala His
 165 170 175

Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe
 180 185 190

Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala Met Ala Lys
 195 200 205

Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His Gln Lys Ala
 210 215 220

Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala
 225 230

<210> 21

<211> 1063

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (177)..(872)

<400> 21

gatacaaatt cgaatgtagg tgctaggcgc gcttgttta gagtgttgt tagggagac 60

tatatggaaatc cacagtccaa tgagttacagg gcctgtcctc cgtgtggcag cttcacccgg 120

gagttgctgg cctggctgcc tacctgcttt cctgagatcc agggactttt cccaga atg 179
 Met
 1

gct ttg ggt gac ctc ctg ctg tct gtc ctc tct gcc cag gaa atg aat 227
 Ala Leu Gly Asp Leu Leu Leu Ser Val Leu Ser Ala Gln Glu Met Asn
 5 10 15

gcc ctt cgt ggc cag gtg ggc ggg gac gtc aat gtg gag atg gac gcc 275
 Ala Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Asp Val Asn Val Glu Met Asp Ala
 20 25 30

gcc ccc ggt gtg gac ctg agc cgc atc ctg aac gag atg cggt gat cag 323
 Ala Pro Gly Val Asp Leu Ser Arg Ile Leu Asn Glu Met Arg Asp Gln
 35 40 45

tat gag aag atg gcg gag aag aac cgc aag gat gct gag gaa tgg ttc 371
 Tyr Glu Lys Met Ala Glu Lys Asn Arg Lys Asp Ala Glu Glu Trp Phe
 50 55 60 65

ttc acc aag aca gag gag ctg aac cga gaa gtg gcc acc aac acg gag 419

Phe Thr Lys Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Thr Asn Thr Glu			
70	75	80	
gcc ctg cag agc agc cggtt gca gag atc acg gag ctc cgc cgc tct gtg			467
Ala Leu Gln Ser Ser Arg Thr Glu Ile Thr Glu Leu Arg Arg Ser Val			
85	90	95	
cag aac ctg gag att gag ctg cag tcc cag ctc agc atg aaa gca tca			515
Gln Asn Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met Lys Ala Ser			
100	105	110	
ctg gag aac agc ctg gca gag aca gag gcg cgc tat ggg gcc cag ctg			563
Leu Glu Asn Ser Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg Tyr Gly Ala Gln Leu			
115	120	125	
gcg cag ctg cag ggc ctc att agc agt gtg gaa cag cag ctg tgt gag			611
Ala Gln Leu Gln Gly Leu Ile Ser Ser Val Glu Gln Gln Leu Cys Glu			
130	135	140	145
ctg cgt tgt gac atg gaa agg cag aat cat gag tac cag gtg ctg ctg			659
Leu Arg Cys Asp Met Glu Arg Gln Asn His Glu Tyr Gln Val Leu Leu			
150	155	160	
gat gtg aag acc cga ctg gag cag gag atc gcc acc tac cgc cgt ctg			707
Asp Val Lys Thr Arg Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Arg Leu			
165	170	175	
ctg gag ggc gag gac gcc cac ctg gct act caa tac tcc tca tcc ctg			755
Leu Glu Gln Glu Asp Ala His Leu Ala Thr Gln Tyr Ser Ser Leu			
180	185	190	
gct tcg cag ccc tcc cga gaa ggc atg gtg acc agc cgc cag gtg cgc			803
Ala Ser Gln Pro Ser Arg Glu Gly Met Val Thr Ser Arg Gln Val Arg			
195	200	205	
acc att gtg gag gaa gtc cag gat ggt aag gtg ttt tcc tcc aga gag			851
Thr Ile Val Glu Val Gln Asp Gly Lys Val Phe Ser Ser Arg Glu			
210	215	220	225
cag gag cac cgc tcc acc cac tgaggccct gtctgcgtat gatagccag			902
Gln Glu His Arg Ser Thr His			
230			
gccaggacc ttaggctgca gctccctgca tctactgcca agcctgaact cctatgagct			962
agctgttgcc ttctgtgttt gctttgtctt gccccttaca gagaggcccc ttgggttgac			1022
cccagaaatt gctaataaag ctttgaagaa gtctgatcct t			1063

<210> 22

<211> 232

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Met	Ala	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Ala	Gln	Glu	Met
1					5				10					15	

Asn	Ala	Leu	Arg	Gly	Gln	Val	Gly	Gly	Asp	Val	Asn	Val	Glu	Met	Asp
					20			25					30		

Ala	Ala	Pro	Gly	Val	Asp	Leu	Ser	Arg	Ile	Leu	Asn	Glu	Met	Arg	Asp
						35		40					45		

Gln	Tyr	Glu	Lys	Met	Ala	Glu	Lys	Asn	Arg	Lys	Asp	Ala	Glu	Glu	Trp
				50			55			60					

Phe	Phe	Thr	Lys	Thr	Glu	Glu	Leu	Asn	Arg	Glu	Val	Ala	Thr	Asn	Thr
					65		70		75				80		

Glu	Ala	Leu	Gln	Ser	Ser	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Glu	Leu	Arg	Arg	Ser
					85				90				95		

Val	Gln	Asn	Leu	Glu	Ile	Glu	Leu	Gln	Ser	Gln	Leu	Ser	Met	Lys	Ala
					100			105					110		

Ser	Leu	Glu	Asn	Ser	Leu	Ala	Glu	Thr	Glu	Ala	Arg	Tyr	Gly	Ala	Gln
						115		120				125			

Leu	Ala	Gln	Leu	Gln	Gly	Leu	Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Gln	Gln	Leu	Cys
						130		135				140			

Glu	Leu	Arg	Cys	Asp	Met	Glu	Arg	Gln	Asn	His	Glu	Tyr	Gln	Val	Leu
					145		150			155			160		

Leu	Asp	Val	Lys	Thr	Arg	Leu	Glu	Gln	Glu	Ile	Ala	Thr	Tyr	Arg	Arg
					165				170				175		

Leu	Leu	Glu	Gly	Glu	Asp	Ala	His	Leu	Ala	Thr	Gln	Tyr	Ser	Ser	Ser
						180		185				190			

Leu	Ala	Ser	Gln	Pro	Ser	Arg	Glu	Gly	Met	Val	Thr	Ser	Arg	Gln	Val
						195		200				205			

Arg	Thr	Ile	Val	Glu	Glu	Val	Gln	Asp	Gly	Lys	Val	Phe	Ser	Ser	Arg
						210		215				220			

Glu	Gln	Glu	His	Arg	Ser	Thr	His							
						225		230						

<210> 23
<211> 1670
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (139)..(1401)

<400> 23
gacaccctca accccatcat cccagggcct cataggctcc atccaggcatt acgtcctcat 60

ccctacctac gggttctgac gaccctgctg tcacacccgc catcccttgg acgcagaccc 120
ttcttagccga ttacatca atg ggt tcc cgg gag aca cct tct tct tgc tct 171
Met Gly Ser Arg Glu Thr Pro Ser Ser Cys Ser
1 5 10

aag acc ctt gaa acc ttg gac ctg gag act tcc gac agc tct agc cct 219
Lys Thr Leu Glu Thr Leu Asp Leu Glu Thr Ser Asp Ser Ser Pro
15 20 25

gat gct gac agt cct ctg gaa gag caa tgg ctg aaa tcc tcc cca gcc 267
Asp Ala Asp Ser Pro Leu Glu Glu Gln Trp Leu Lys Ser Ser Pro Ala
30 35 40

ctg aag gag gac agt gtg gat gtg gta ctg gaa gac tgc aaa gag cct 315
Leu Lys Glu Asp Ser Val Asp Val Val Leu Glu Asp Cys Lys Glu Pro
45 50 55

ctg tcc ccc tcc tcg cct ccg aca ggc aga gag atg atc agg tac gaa 363
Leu Ser Pro Ser Ser Pro Pro Thr Gly Arg Glu Met Ile Arg Tyr Glu
60 65 70 75

gtc aaa gtg aac cga cgg agc att gaa gac atc tgc ctc tgc tgt gga 411
Val Lys Val Asn Arg Arg Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu Cys Cys Gly
80 85 90

act ctc cag gtg tac act cgg cac ccc ttg ttt gag gga ggg tta tgt 459
Thr Leu Gln Val Tyr Thr Arg His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Leu Cys
95 100 105

gcc cca tgt aag gat aag ttc ctg gag tcc ctc ttc ctg tat gat gat 507
Ala Pro Cys Lys Asp Lys Phe Leu Glu Ser Leu Phe Leu Tyr Asp Asp
110 115 120

gat gga cac cag agt tac tgc acc atc tgc tgt tcc ggg ggt acc ctg 555

Asp Gly His Gln Ser Tyr Cys Thr Ile Cys Cys Ser Gly Gly Thr Leu			
125	130	135	
ttc atc tgt gag agc ccc gac tgt acc aga tgc tac tgt ttc gag tgt			603
Phe Ile Cys Glu Ser Pro Asp Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys			
140	145	150	155
gtg gac atc ctg gtg ggc ccc ggg acc tca gag agg atc aat gcc atg			651
Val Asp Ile Leu Val Gly Pro Gly Thr Ser Glu Arg Ile Asn Ala Met			
160	165	170	
gcc tgc tgg gtt tgc ttc ctg tgc ctg ccc ttc tca cggtt ggtt ggtt			699
Ala Cys Trp Val Cys Phe Leu Cys Leu Pro Phe Ser Arg Ser Gly Leu			
175	180	185	
ctg cag agg cgc aag agg tgg cggtt cac cag ctg aag gcc ttc cat gat			747
Leu Gln Arg Arg Lys Arg Trp Arg His Gln Leu Lys Ala Phe His Asp			
190	195	200	
caa gag gga gcg ggc cct atg gag ata tac aag aca gtg tct gca tgg			795
Gln Glu Gly Ala Gly Pro Met Glu Ile Tyr Lys Thr Val Ser Ala Trp			
205	210	215	
aag aga cag cca gtg cggtt gta ctg agc ctt ttt aga aat att gat aaa			843
Lys Arg Gln Pro Val Arg Val Leu Ser Leu Phe Arg Asn Ile Asp Lys			
220	225	230	235
gta cta aag agt ttg ggc ttt ttg gaa agc gggtt tct gggtt tct ggg gga			891
Val Leu Lys Ser Leu Gly Phe Leu Glu Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly			
240	245	250	
gga acg ctg aag tac gtg gaa gat gtc aca aat gtc gtg agg aga gac			939
Gly Thr Leu Lys Tyr Val Glu Asp Val Thr Asn Val Val Arg Arg Asp			
255	260	265	
gtg gag aaa tgg ggc ccc ttt gac ctg gtg tac ggc tgc acg cag ccc			987
Val Glu Lys Trp Gly Pro Phe Asp Leu Val Tyr Gly Ser Thr Gln Pro			
270	275	280	
cta ggc agc tct tgt gat cgc tgt ccc ggc tgg tac atg ttc cag ttc			1035
Leu Gly Ser Ser Cys Asp Arg Cys Pro Gly Trp Tyr Met Phe Gln Phe			
285	290	295	
cac cgg atc ctg cag tat gcg ctg cct cgc cag gag agt cag cgg ccc			1083
His Arg Ile Leu Gln Tyr Ala Leu Pro Arg Gln Glu Ser Gln Arg Pro			
300	305	310	315
ttc ttc tgg ata ttc atg gac aat ctg ctg act gag gat gac caa			1131
Phe Phe Trp Ile Phe Met Asp Asn Leu Leu Leu Thr Glu Asp Asp Gln			
320	325	330	

gag aca act acc cgc ttc ctt cag aca gag gct gtg acc ctc cag gat Glu Thr Thr Arg Phe Leu Gln Thr Glu Ala Val Thr Leu Gln Asp 335 340 345	1179
gtc cgt ggc aga gac tac cag aat gct atg cgg gtg tgg agc aac att Val Arg Gly Arg Asp Tyr Gln Asn Ala Met Arg Val Trp Ser Asn Ile 350 355 360	1227
cca ggg ctg aag agc aag cat gcg ccc ctg acc cca aag gaa gaa gag Pro Gly Leu Lys Ser Lys His Ala Pro Leu Thr Pro Lys Glu Glu Glu 365 370 375	1275
tat ctg caa gcc caa gtc aga agc agg agc aag ctg gac gcc ccg aaa Tyr Leu Gln Ala Gln Val Arg Ser Arg Ser Lys Leu Asp Ala Pro Lys 380 385 390 395	1323
gtt gac ctc ctg gtg aag aac tgc ctt ctc ccg ctg aga gag tac ttc Val Asp Leu Leu Val Lys Asn Cys Leu Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe 400 405 410	1371
aag tat ttt tct caa aac tca ctt cct ctt tagaaatgaa tcaccataag Lys Tyr Phe Ser Gln Asn Ser Leu Pro Leu 415 420	1421
atgaaaagtct ttcctagaac cagggcagat ttcttcctaa ggtctttcc ctccacagtt 1481 ttctctgggt tgctttcagg cttcgggtt tcttcctgt ttgattgcc a gatgcctct 1541 gtgcagctca ctttgcgggg tgggaggtgc ctacggctct gcacaagttc ccgggtggat 1601 aacctgccat gtttctctga aactgtgtgt acctgttg aagttttca aatatatcat 1661 aggattgtt	1670

<210> 24
<211> 421
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 24
Met Gly Ser Arg Glu Thr Pro Ser Ser Cys Ser Lys Thr Leu Glu Thr
1 5 10 15

Leu Asp Leu Glu Thr Ser Asp Ser Ser Ser Pro Asp Ala Asp Ser Pro
20 25 30

Leu Glu Glu Gln Trp Leu Lys Ser Ser Pro Ala Leu Lys Glu Asp Ser
35 40 45

Val Asp Val Val Leu Glu Asp Cys Lys Glu Pro Leu Ser Pro Ser Ser
 50 55 60

Pro Pro Thr Gly Arg Glu Met Ile Arg Tyr Glu Val Lys Val Asn Arg
 65 70 75 80

Arg Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu Cys Cys Gly Thr Leu Gln Val Tyr
 85 90 95

Thr Arg His Pro Leu Phe Glu Gly Leu Cys Ala Pro Cys Lys Asp
 100 105 110

Lys Phe Leu Glu Ser Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Gly His Gln Ser
 115 120 125

Tyr Cys Thr Ile Cys Cys Ser Gly Gly Thr Leu Phe Ile Cys Glu Ser
 130 135 140

Pro Asp Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ile Leu Val
 145 150 155 160

Gly Pro Gly Thr Ser Glu Arg Ile Asn Ala Met Ala Cys Trp Val Cys
 165 170 175

Phe Leu Cys Leu Pro Phe Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Lys
 180 185 190

Arg Trp Arg His Gln Leu Lys Ala Phe His Asp Gln Glu Gly Ala Gly
 195 200 205

Pro Met Glu Ile Tyr Lys Thr Val Ser Ala Trp Lys Arg Gln Pro Val
 210 215 220

Arg Val Leu Ser Leu Phe Arg Asn Ile Asp Lys Val Leu Lys Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Phe Leu Glu Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Lys Tyr
 245 250 255

Val Glu Asp Val Thr Asn Val Val Arg Arg Asp Val Glu Lys Trp Gly
 260 265 270

Pro Phe Asp Leu Val Tyr Gly Ser Thr Gln Pro Leu Gly Ser Ser Cys
 275 280 285

Asp Arg Cys Pro Gly Trp Tyr Met Phe Gln Phe His Arg Ile Leu Gln
 290 295 300

Tyr Ala Leu Pro Arg Gln Glu Ser Gln Arg Pro Phe Phe Trp Ile Phe

305	310	315	320
Met Asp Asn Leu Leu Leu Thr Glu Asp Asp Gln Glu Thr Thr Thr Arg			
325		330	335
Phe Leu Gln Thr Glu Ala Val Thr Leu Gln Asp Val Arg Gly Arg Asp			
340		345	350
Tyr Gln Asn Ala Met Arg Val Trp Ser Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser			
355		360	365
Lys His Ala Pro Leu Thr Pro Lys Glu Glu Tyr Leu Gln Ala Gln			
370		375	380
Val Arg Ser Arg Ser Lys Leu Asp Ala Pro Lys Val Asp Leu Leu Val			
385		390	395
Lys Asn Cys Leu Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe Lys Tyr Phe Ser Gln			
405		410	415
Asn Ser Leu Pro Leu			
420			

<210> 25

<211> 1705

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (485)..(1645)

<400> 25

cccatctcca cccctccccct gaaccccact cccactgag gtccccaaac cccacccctc 60

actccaccct gagggcccca tcctctgaac cccaatcccc cagccccact gagctcttaa 120

ccctccccac ctgagggttc ctttccctg cccgtcccc agtttcctag ctccccaccc 180

caagtgaccc cccgcagctc ctgcgccctc ccactgaaaa ccggcactga agggctgccc 240

cgcccccggcc cttccccggcc cccgcgggac acgcccagat tctttcccc catagcctgg 300

tgacctctgg ccacccgctg tcccaggtgg gcctggatcc ttccagctca ttctttgcct 360

gcgcgtccc tcgttccatg gcccagtcct ccccggggac cctgagcctg gaagccccgg 420

accactggaa ctttgaaccc accagctggc tgtacccgga gccgtggcag cagccctcat 480

cccc atg gcg gcc atc cca gcc ctg gac cca gag gcc gag ccc agc atg		529
Met Ala Ala Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Ala Glu Pro Ser Met		
1 5 10 15		
gac gtg att ttg gtg gga tcc agt gag ctc tca agc tcc gtt tca ccc		577
Asp Val Ile Leu Val Gly Ser Ser Glu Leu Ser Ser Val Ser Pro		
20 25 30		
ggg aca ggc aga gat ctt att gca tat gaa gtc aag gct aac cag cga		625
Gly Thr Gly Arg Asp Leu Ile Ala Tyr Glu Val Lys Ala Asn Gln Arg		
35 40 45		
aat ata gaa gac atc tgc atc tgc tgc gga agt ctc cag gtt cac aca		673
Asn Ile Glu Asp Ile Cys Ile Cys Cys Gly Ser Leu Gln Val His Thr		
50 55 60		
cag cac cct ctg ttt gag gga ggg atc tgc gcc cca tgt aag gac aag		721
Gln His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Ile Cys Ala Pro Cys Lys Asp Lys		
65 70 75		
ttc ctg gat gcc ctc ttc ctg tac gac gat gac ggg tac caa tcc tac		769
Phe Leu Asp Ala Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Asp Gly Tyr Gln Ser Tyr		
80 85 90 95		
tgc tcc atc tgc tcc gga gag acg ctg ctc atc tgc gga aac cct		817
Cys Ser Ile Cys Cys Ser Gly Glu Thr Leu Leu Ile Cys Gly Asn Pro		
100 105 110		
gat tgc acc cga tgc tac tgc ttc gag tgt gtg gat agc ctg gtc ggc		865
Asp Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ser Leu Val Gly		
115 120 125		
ccc ggg acc tcg ggg aag gtg cac gcc atg agc aac tgg gtg tgc tac		913
Pro Gly Thr Ser Gly Lys Val His Ala Met Ser Asn Trp Val Cys Tyr		
130 135 140		
ctg tgc ctg ccg tcc tcc cga agc ggg ctg ctg cag cgt cg agg aag		961
Leu Cys Leu Pro Ser Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Arg Lys		
145 150 155		
tgg cgc agc cag ctc aag gcc ttc tac gac cga gag tcg gag aat ccc		1009
Trp Arg Ser Gln Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Glu Ser Glu Asn Pro		
160 165 170 175		
ctt gag atg ttc gaa acc gtg cct gtg tgg agg aga cag cca gtc cgg		1057
Leu Glu Met Phe Glu Thr Val Pro Val Trp Arg Arg Gln Pro Val Arg		
180 185 190		
gtg ctg tcc ctt ttt gaa gac atc aag aaa gag ctg acg agt ttg ggc		1105

Val Leu Ser Leu Phe Glu Asp Ile Lys Lys Glu Leu Thr Ser Leu Gly			
195	200	205	
ttt ttg gaa agt ggt tct gac ccg gga caa ctg aag cat gtg gtt gat			1153
Phe Leu Glu Ser Gly Ser Asp Pro Gly Gln Leu Lys His Val Val Asp			
210	215	220	
gtc aca gac aca gtg agg aag gat gtg gag gag tgg gga ccc ttc gat			1201
Val Thr Asp Thr Val Arg Lys Asp Val Glu Glu Trp Gly Pro Phe Asp			
225	230	235	
ctt gtg tac ggc gcc aca gct ccc ctg ggc cac acc tgt gac cgt cct			1249
Leu Val Tyr Gly Ala Thr Ala Pro Leu Gly His Thr Cys Asp Arg Pro			
240	245	250	255
ccc agc tgg tac ctg ttc cag ttc cac cgg ttc ctg cag tac gca cgg			1297
Pro Ser Trp Tyr Leu Phe Gln Phe His Arg Phe Leu Gln Tyr Ala Arg			
260	265	270	
ccc aag cca ggc agc ccc agg ccc ttc ttc tgg atg ttc gtg gac aat			1345
Pro Lys Pro Gly Ser Pro Arg Pro Phe Phe Trp Met Phe Val Asp Asn			
275	280	285	
ctg gtg ctg aac aag gaa gac ctg gac gtc gca tct cgc ttc ctg gag			1393
Leu Val Leu Asn Lys Glu Asp Leu Asp Val Ala Ser Arg Phe Leu Glu			
290	295	300	
atg gag cca gtc acc atc cca gat gtc cac ggc gga tcc ttg cag aat			1441
Met Glu Pro Val Thr Ile Pro Asp Val His Gly Ser Leu Gln Asn			
305	310	315	
gct gtc cgc gtg tgg agc aac atc cca gcc ata agg agc agc agg cac			1489
Ala Val Arg Val Trp Ser Asn Ile Pro Ala Ile Arg Ser Ser Arg His			
320	325	330	335
tgg gct ctg gtt tcg gaa gaa ttg tcc ctg ctg gcc cag aac aag			1537
Trp Ala Leu Val Ser Glu Glu Leu Ser Leu Leu Ala Gln Asn Lys			
340	345	350	
cag agc tcg aag ctc gcg gcc aag tgg ccc acc aag ctg gtg aag aac			1585
Gln Ser Ser Lys Leu Ala Ala Lys Trp Pro Thr Lys Leu Val Lys Asn			
355	360	365	
tgc ttt ctc ccc cta aga gaa tat ttc aag tat ttt tca aca gaa ctc			1633
Cys Phe Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe Lys Tyr Phe Ser Thr Glu Leu			
370	375	380	
act tcc tct tta taaatgagtc actatactgt gaagaaaaag acttttccta			1685
Thr Ser Ser Leu			
385			

gaacaaaggc aactttcctc 1705

<210> 26

<211> 387

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Ala Ala Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Ala Glu Pro Ser Met Asp
1 5 10 15

Val Ile Leu Val Gly Ser Ser Glu Leu Ser Ser Ser Val Ser Pro Gly
20 25 30

Thr Gly Arg Asp Leu Ile Ala Tyr Glu Val Lys Ala Asn Gln Arg Asn
35 40 45

Ile Glu Asp Ile Cys Ile Cys Cys Gly Ser Leu Gln Val His Thr Gln
50 55 60

His Pro Leu Phe Glu Gly Ile Cys Ala Pro Cys Lys Asp Lys Phe
65 70 75 80

Leu Asp Ala Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Gly Tyr Gln Ser Tyr Cys
85 90 95

Ser Ile Cys Cys Ser Gly Glu Thr Leu Leu Ile Cys Gly Asn Pro Asp
100 105 110

Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ser Leu Val Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Ser Gly Lys Val His Ala Met Ser Asn Trp Val Cys Tyr Leu
130 135 140

Cys Leu Pro Ser Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Arg Lys Trp
145 150 155 160

Arg Ser Gln Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Glu Ser Glu Asn Pro Leu
165 170 175

Glu Met Phe Glu Thr Val Pro Val Trp Arg Arg Gln Pro Val Arg Val
180 185 190

Leu Ser Leu Phe Glu Asp Ile Lys Lys Glu Leu Thr Ser Leu Gly Phe
195 200 205

Leu Glu Ser Gly Ser Asp Pro Gly Gln Leu Lys His Val Val Asp Val

210	215	220
Thr Asp Thr Val Arg Lys Asp Val Glu Glu Trp Gly Pro Phe Asp Leu		
225	230	235
Val Tyr Gly Ala Thr Ala Pro Leu Gly His Thr Cys Asp Arg Pro Pro		
245	250	255
Ser Trp Tyr Leu Phe Gln Phe His Arg Phe Leu Gln Tyr Ala Arg Pro		
260	265	270
Lys Pro Gly Ser Pro Arg Pro Phe Phe Trp Met Phe Val Asp Asn Leu		
275	280	285
Val Leu Asn Lys Glu Asp Leu Asp Val Ala Ser Arg Phe Leu Glu Met		
290	295	300
Glu Pro Val Thr Ile Pro Asp Val His Gly Gly Ser Leu Gln Asn Ala		
305	310	315
Val Arg Val Trp Ser Asn Ile Pro Ala Ile Arg Ser Ser Arg His Trp		
325	330	335
Ala Leu Val Ser Glu Glu Leu Ser Leu Leu Ala Gln Asn Lys Gln		
340	345	350
Ser Ser Lys Leu Ala Ala Lys Trp Pro Thr Lys Leu Val Lys Asn Cys		
355	360	365
Phe Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe Lys Tyr Phe Ser Thr Glu Leu Thr		
370	375	380
Ser Ser Leu		
385		

<210> 27
<211> 1560
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (147)..(1367)

<400> 27
ggtgcatgct agggcattac gaaggctgggt ggtgcagagg ctcccaaggcc aggtctttt 60

gtcggtggtg agggacgctc actctcactc cgcggtgtgt ctccccgtct gtgtgctgtg 120

atctcctctg tgagagaagg gccagg atg ttc gag gtc ctg gtg ctg aag att		173
Met Phe Glu Val Leu Val Leu Lys Ile		
1	5	
gaa gat cca ggt tgc ttc tgg gta att ata aaa gga tgt agt cat ttt		221
Glu Asp Pro Gly Cys Phe Trp Val Ile Lys Gly Cys Ser His Phe		
10	15	20
25		
tta gaa caa gaa gtt gac tac caa aaa cta aac act gcc atg aat gac		269
Leu Glu Gln Glu Val Asp Tyr Gln Lys Leu Asn Thr Ala Met Asn Asp		
30	35	40
ttc tat aac agc atg tgt cag gac gta gaa atg aaa cca tta atg ctg		317
Phe Tyr Asn Ser Met Cys Gln Asp Val Glu Met Lys Pro Leu Met Leu		
45	50	55
gaa gaa ggg cag gtg tgt gtg tac tgc cag gag ctg aag tgc tgg		365
Glu Glu Gly Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Gln Glu Leu Lys Cys Trp		
60	65	70
tgc agg gct ctg att aag tcc atc atc tct tct gca gac cat tac ctg		413
Cys Arg Ala Leu Ile Lys Ser Ile Ile Ser Ser Ala Asp His Tyr Leu		
75	80	85
gca gag tgt ttc ctg gtc gat ttt gcc aag tat att cca gta aaa tct		461
Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Tyr Ile Pro Val Lys Ser		
90	95	100
105		
aaa aac atc cga gtt gca gta gag tct ttt atg cag ctt cct tac aga		509
Lys Asn Ile Arg Val Ala Val Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg		
110	115	120
gca aaa aaa ttc aga ctt tac ggt aca aag cct gtg aca ttg cac att		557
Ala Lys Lys Phe Arg Leu Tyr Gly Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile		
125	130	135
gac ttc tgt gaa gac aat gct gag att gta cct gcc aca aaa tgg gac		605
Asp Phe Cys Glu Asp Asn Ala Glu Ile Val Pro Ala Thr Lys Trp Asp		
140	145	150
agt gca gcc atc cag tac ttt cag aac ctt cta aga gca act acc caa		653
Ser Ala Ala Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Arg Ala Thr Thr Gln		
155	160	165
gtg gaa gca aaa cta tgt gcg gtg gaa gaa gat act ttt gag gtt tac		701
Val Glu Ala Lys Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe Glu Val Tyr		
170	175	180
185		
ctt tat gca aca ata aaa aat gaa aaa gtt tgt gtt aat gat gac cta		749

Leu Tyr Ala Thr Ile Lys Asn Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu			
190	195	200	
gtt gca aag aat ttt gct tat tat gtg tca cca atg ggg aat aaa aac			797
Val Ala Lys Asn Phe Ala Tyr Tyr Val Ser Pro Met Gly Asn Lys Asn			
205	210	215	
ctc aat cct ttg gag aaa ccc agg cag agt ctc aat tcg gtg acc tgc			845
Leu Asn Pro Leu Glu Lys Pro Arg Gln Ser Leu Asn Ser Val Thr Cys			
220	225	230	
tcc agt aag ctc agc cca tca ctt act ctg tgg cca atg ctt cta caa			893
Ser Ser Lys Leu Ser Pro Ser Leu Thr Leu Trp Pro Met Leu Leu Gln			
235	240	245	
gga aaa gac tat cac aga atg gaa aat aaa gct cta aac tat aag gat			941
Gly Lys Asp Tyr His Arg Met Glu Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Lys Asp			
250	255	260	265
tcc ttg aca gac tcg cct aaa atg atg ctt gag aag cag cag cag agc			989
Ser Leu Thr Asp Ser Pro Lys Met Met Leu Glu Lys Gln Gln Gln Ser			
270	275	280	
ctc cct tta aag cac acg gag aag tgt act gaa tct tct gtg tac tgg			1037
Leu Pro Leu Lys His Thr Glu Lys Cys Thr Glu Ser Ser Val Tyr Trp			
285	290	295	
cca acc aaa aga ggc ata acc ata tat gct gat cca gat gtt cca tca			1085
Pro Thr Lys Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Ser			
300	305	310	
gta agt ggg tct agc cag agg ccg aat gag aag cca ctg cgg ttg act			1133
Val Ser Gly Ser Ser Gln Arg Pro Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr			
315	320	325	
gaa aag aaa gac tgt gac gag aag aac ggc tgt gta aaa tta ctg cag			1181
Glu Lys Lys Asp Cys Asp Glu Lys Asn Gly Cys Val Lys Leu Leu Gln			
330	335	340	345
ttt cta aat cct gat cct ttg aga gct gat ggg acc tca gac ctg cac			1229
Phe Leu Asn Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Thr Ser Asp Leu His			
350	355	360	
cag ttg cag aag gtg aag ctg ggc aca ctg cag cct ggg gtg gtg ctc			1277
Gln Leu Gln Lys Val Lys Leu Gly Thr Leu Gln Pro Gly Val Val Leu			
365	370	375	
cg aac agg atc gag ccc tgc cta acc ctg gag aaa tca cct ctg tcg			1325
Arg Asn Arg Ile Glu Pro Cys Leu Thr Leu Glu Lys Ser Pro Leu Ser			
380	385	390	

gca gac ctg aag aag gtg aac atg ttc tta aag cca gac tcc
 Ala Asp Leu Lys Lys Val Asn Met Phe Leu Lys Pro Asp Ser
 395 400 405

tgacgacatg ccagcccttt ccaacacaga gtgttgcttt gtttgcttt gtctgttctg 1427
 ttctaagagt gacggggatg aaatacaggc cttgcgcgt cctgggcatg cattcatcac 1487
 tgaaccatac cccaattcca taggaggatt ttaaataaac acttctaagg ctacattgca 1547
 gaattcttgc tcc 1560

<210> 28
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28
 Met Phe Glu Val Leu Val Leu Lys Ile Glu Asp Pro Gly Cys Phe Trp
 1 5 10 15

Val Ile Ile Lys Gly Cys Ser His Phe Leu Glu Gln Glu Val Asp Tyr
 20 25 30

Gln Lys Leu Asn Thr Ala Met Asn Asp Phe Tyr Asn Ser Met Cys Gln
 35 40 45

Asp Val Glu Met Lys Pro Leu Met Leu Glu Gly Gln Val Cys Val
 50 55 60

Val Tyr Cys Gln Glu Leu Lys Cys Trp Cys Arg Ala Leu Ile Lys Ser
 65 70 75 80

Ile Ile Ser Ser Ala Asp His Tyr Leu Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp
 85 90 95

Phe Ala Lys Tyr Ile Pro Val Lys Ser Lys Asn Ile Arg Val Ala Val
 100 105 110

Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg Ala Lys Lys Phe Arg Leu Tyr
 115 120 125

Gly Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile Asp Phe Cys Glu Asp Asn Ala
 130 135 140

Glu Ile Val Pro Ala Thr Lys Trp Asp Ser Ala Ala Ile Gln Tyr Phe
 145 150 155 160

Gln Asn Leu Leu Arg Ala Thr Thr Gln Val Glu Ala Lys Leu Cys Ala
 165 170 175
 Val Glu Glu Asp Thr Phe Glu Val Tyr Leu Tyr Ala Thr Ile Lys Asn
 180 185 190
 Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu Val Ala Lys Asn Phe Ala Tyr
 195 200 205
 Tyr Val Ser Pro Met Gly Asn Lys Asn Leu Asn Pro Leu Glu Lys Pro
 210 215 220
 Arg Gln Ser Leu Asn Ser Val Thr Cys Ser Ser Lys Leu Ser Pro Ser
 225 230 235 240
 Leu Thr Leu Trp Pro Met Leu Leu Gln Gly Lys Asp Tyr His Arg Met
 245 250 255
 Glu Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Lys Asp Ser Leu Thr Asp Ser Pro Lys
 260 265 270
 Met Met Leu Glu Lys Gln Gln Ser Leu Pro Leu Lys His Thr Glu
 275 280 285
 Lys Cys Thr Glu Ser Ser Val Tyr Trp Pro Thr Lys Arg Gly Ile Thr
 290 295 300
 Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Ser Val Ser Gly Ser Ser Gln Arg
 305 310 315 320
 Pro Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr Glu Lys Lys Asp Cys Asp Glu
 325 330 335
 Lys Asn Gly Cys Val Lys Leu Leu Gln Phe Leu Asn Pro Asp Pro Leu
 340 345 350
 Arg Ala Asp Gly Thr Ser Asp Leu His Gln Leu Gln Lys Val Lys Leu
 355 360 365
 Gly Thr Leu Gln Pro Gly Val Val Leu Arg Asn Arg Ile Glu Pro Cys
 370 375 380
 Leu Thr Leu Glu Lys Ser Pro Leu Ser Ala Asp Leu Lys Lys Val Asn
 385 390 395 400
 Met Phe Leu Lys Pro Asp Ser
 405

<210> 29
<211> 1301
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (97)..(1167)

<400> 29
ttacagattg aagatccagg ttgcttctgg gttattataa aagggtgttag tccctttta 60

gatcatgatg tcgattatca aaaattaaat agtgcc atg aat gac ttc tac aac 114
Met Asn Asp Phe Tyr Asn
1 5

agc acg tgt caa gat ata gaa ata aaa ccc tta aca ttg gaa gaa gga 162
Ser Thr Cys Gln Asp Ile Glu Ile Lys Pro Leu Thr Leu Glu Gly
10 15 20

cag gtg tgt gtg gtc tat tgt gag gag cta aag tgc tgg tgc agg gcc 210
Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Glu Glu Leu Lys Cys Trp Cys Arg Ala
25 30 35

att gtc aaa tca att acg tct tcc gca gac cag tac ctg gca gaa tgt 258
Ile Val Lys Ser Ile Thr Ser Ser Ala Asp Gln Tyr Leu Ala Glu Cys
40 45 50

ttc ctt gtg gac ttt gcc aag aac att cca gtc aaa tct aaa agc atc 306
Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Asn Ile Pro Val Lys Ser Lys Ser Ile
55 60 65 70

cga gtt gta gta gaa tcg ttt atg cag ctt ccc tat aga gca aaa aaa 354
Arg Val Val Val Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg Ala Lys Lys
75 80 85

ttc agc ctg tac tgc aca aag cct gtc aca tta cac att gac ttc tgc 402
Phe Ser Leu Tyr Cys Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile Asp Phe Cys
90 95 100

cga gac agt act gac att gtg cct gcc aag aag tgg gac aat gca gct 450
Arg Asp Ser Thr Asp Ile Val Pro Ala Lys Lys Trp Asp Asn Ala Ala
105 110 115

att cag tac ttt cag aac ctt ctg aaa gca act acc cag gtg gaa gcc 498
Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Lys Ala Thr Thr Gln Val Glu Ala
120 125 130

aga tta tgt gct gtg gaa gaa gat aca ttt gag gtt tac ctt tat gta 546
Arg Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe Glu Val Tyr Leu Tyr Val

135	140	145	150	
act ata aaa gat gaa aaa gtt tgt gtt aat gat gat ctt gtt gca aag Thr Ile Lys Asp Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu Val Ala Lys				594
155	160		165	
aac tat gct tgt tat atg tca cct aca aag aat aaa aac ctt gat tat Asn Tyr Ala Cys Tyr Met Ser Pro Thr Lys Asn Lys Asn Leu Asp Tyr				642
170	175		180	
tta gaa aaa cca aga ttg aat ata aaa tca gca ccc tcc ttc aat aaa Leu Glu Lys Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ser Ala Pro Ser Phe Asn Lys				690
185	190		195	
ctc aat cca gca ctt aca ctc tgg cca atg ttt ttg caa gga aaa gat Leu Asn Pro Ala Leu Thr Leu Trp Pro Met Phe Leu Gln Gly Lys Asp				738
200	205		210	
gtt caa gga atg gaa gat tca cat ggt gta aat ttt ccg gca caa tct Val Gln Gly Met Glu Asp Ser His Gly Val Asn Phe Pro Ala Gln Ser				786
215	220		225	
230				
ctg caa cat aca tgg tgc aag ggt att gtc ggt gac ctc agg cca aca Leu Gln His Thr Trp Cys Lys Gly Ile Val Gly Asp Leu Arg Pro Thr				834
235	240		245	
gcc aca gca cag gac aaa gct gta aaa tgt aat atg gat tca ttg aga Ala Thr Ala Gln Asp Lys Ala Val Lys Cys Asn Met Asp Ser Leu Arg				882
250	255		260	
gat tca cct aaa gac aaa tct gaa aag aaa cac cat tgc atc tct tta Asp Ser Pro Lys Asp Lys Ser Glu Lys Lys His His Cys Ile Ser Leu				930
265	270		275	
aaa gat aca aat aag cgt gtt gaa tcc tca gtg tac tgg cca gca aaa Lys Asp Thr Asn Lys Arg Val Glu Ser Ser Val Tyr Trp Pro Ala Lys				978
280	285		290	
aga ggc ata acc ata tat gct gat cca gat gta cca gaa gca agt gct Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Glu Ala Ser Ala				1026
295	300		305	
310				
tta agt cag aag tca aat gag aaa cct ctt aga ttg act gag aag aaa Leu Ser Gln Lys Ser Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr Glu Lys Lys				1074
315	320		325	
gaa tat gat gag aag aat agc tgt gtg aaa tta ctg cag ttt tta aat Glu Tyr Asp Glu Lys Asn Ser Cys Val Lys Leu Leu Gln Phe Leu Asn				1122
330	335		340	

cct gat cct ttg aga gct gac gga atc tct gat ctc cag cag act 1167
 Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Ile Ser Asp Leu Gln Gln Thr
 345 350 355

tgagattaga agagaaactc ctttagatggg ggacttaacc tgaagacatc cttagaaaa 1227

cgatcgaatg gattgttgct tctgagaaat tgcccttgt ttttggata ataaacgatc 1287

ttcctttgg taaa 1301

<210> 30

<211> 357

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Asn Asp Phe Tyr Asn Ser Thr Cys Gln Asp Ile Glu Ile Lys Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Glu Glu Gly Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Glu Glu Leu
 20 25 30

Lys Cys Trp Cys Arg Ala Ile Val Lys Ser Ile Thr Ser Ser Ala Asp
 35 40 45

Gln Tyr Leu Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Asn Ile Pro
 50 55 60

Val Lys Ser Lys Ser Ile Arg Val Val Val Glu Ser Phe Met Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Tyr Arg Ala Lys Lys Phe Ser Leu Tyr Cys Thr Lys Pro Val Thr
 85 90 95

Leu His Ile Asp Phe Cys Arg Asp Ser Thr Asp Ile Val Pro Ala Lys
 100 105 110

Lys Trp Asp Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Lys Ala
 115 120 125

Thr Thr Gln Val Glu Ala Arg Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe
 130 135 140

Glu Val Tyr Leu Tyr Val Thr Ile Lys Asp Glu Lys Val Cys Val Asn
 145 150 155 160

Asp Asp Leu Val Ala Lys Asn Tyr Ala Cys Tyr Met Ser Pro Thr Lys
 165 170 175

Asn Lys Asn Leu Asp Tyr Leu Glu Lys Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ser
 180 185 190

 Ala Pro Ser Phe Asn Lys Leu Asn Pro Ala Leu Thr Leu Trp Pro Met
 195 200 205

 Phe Leu Gln Gly Lys Asp Val Gln Gly Met Glu Asp Ser His Gly Val
 210 215 220

 Asn Phe Pro Ala Gln Ser Leu Gln His Thr Trp Cys Lys Gly Ile Val
 225 230 240

 Gly Asp Leu Arg Pro Thr Ala Thr Ala Gln Asp Lys Ala Val Lys Cys
 245 250 255

 Asn Met Asp Ser Leu Arg Asp Ser Pro Lys Asp Lys Ser Glu Lys Lys
 260 265 270

 His His Cys Ile Ser Leu Lys Asp Thr Asn Lys Arg Val Glu Ser Ser
 275 280 285

 Val Tyr Trp Pro Ala Lys Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp
 290 295 300

 Val Pro Glu Ala Ser Ala Leu Ser Gln Lys Ser Asn Glu Lys Pro Leu
 305 310 315 320

 Arg Leu Thr Glu Lys Lys Glu Tyr Asp Glu Lys Asn Ser Cys Val Lys
 325 330 335

 Leu Leu Gln Phe Leu Asn Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Ile Ser
 340 345 350

 Asp Leu Gln Gln Thr
 355

<210> 31
 <211> 1280
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (122)..(1219)

<400> 31
 tgagggctg agaagagagc aattcacact tgattagctc ccaggctcct gaattgagca 60

gaggaggcta gaccgctgag ctgcgcaccc cagaggctgc tctaccctgg ctcagacgac 120
 c atg cag cct tat caa cgg ctt ctg gcg ctt ggc ttc ctt ctg tta acc 169
 Met Gln Pro Tyr Gln Arg Leu Leu Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 ctg ccc tgg ggc cag aca tcc gag ttt caa gac tct gac ctt ttg cag 217
 Leu Pro Trp Gly Gln Thr Ser Glu Phe Gln Asp Ser Asp Leu Leu Gln
 20 25 30
 ttt ctg gga tta gag aaa gcg cct tca cct cac agg ttc caa cct gtg 265
 Phe Leu Gly Leu Glu Lys Ala Pro Ser Pro His Arg Phe Gln Pro Val
 35 40 45
 cct cgc gtc tta agg aaa atc atc cgg gct cga gaa gcc gct gca gcc 313
 Pro Arg Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Ala Arg Glu Ala Ala Ala Ala
 50 55 60
 agt ggg gcc tcg cag gac tta tgc tac gtg aag gag ctg ggt gtt cgt 361
 Ser Gly Ala Ser Gln Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg
 65 70 75 80
 ggg aac ctg ctt cag ctt ctc cca gac cag ggt ttt ttc ctt aat aca 409
 Gly Asn Leu Leu Gln Leu Leu Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Asn Thr
 85 90 95
 cag aaa cct ttc caa gat ggc tcc tgt ctc cag aag gtc ctc tat ttt 457
 Gln Lys Pro Phe Gln Asp Gly Ser Cys Leu Gln Lys Val Leu Tyr Phe
 100 105 110
 aac ttg tct gcc atc aaa gaa aag gca aag ttg acc atg gcc cag ctg 505
 Asn Leu Ser Ala Ile Lys Glu Lys Ala Lys Leu Thr Met Ala Gln Leu
 115 120 125
 act cta gac ttg ggg ccc agg tcc tac tat aac ctg cga cca gag ctg 553
 Thr Leu Asp Leu Gly Pro Arg Ser Tyr Tyr Asn Leu Arg Pro Glu Leu
 130 135 140
 gtg gtt gct ctg tct gtg gtt cag gac cgg ggc gtg tgg ggg cga tcc 601
 Val Val Ala Leu Ser Val Val Gln Asp Arg Gly Val Trp Gly Arg Ser
 145 150 155 160
 cac cct aag gtg ggc aga ttg ctt ttt ctg cgg tct gtc cct ggg cct 649
 His Pro Lys Val Gly Arg Leu Leu Phe Leu Arg Ser Val Pro Gly Pro
 165 170 175
 caa ggt cag ctc cag ttc aac ctg cag ggt gcg ctt aag gat tgg agc 697
 Gln Gly Gln Leu Gln Phe Asn Leu Gln Gly Ala Leu Lys Asp Trp Ser
 180 185 190

agc aac cga ctg aag aat ttg gac tta cac tta gag att ttg gtc aaa Ser Asn Arg Leu Lys Asn Leu Asp Leu His Leu Glu Ile Leu Val Lys 195 200 205	745
gag gac aga tac tcc agg gta act gtc cag ccc gag aac ccc tgt gac Glu Asp Arg Tyr Ser Arg Val Thr Val Gln Pro Glu Asn Pro Cys Asp 210 215 220	793
ccg ctg ctc cgc tct cta cat gcc tcg ctg gtg gta acc ctc aat Pro Leu Leu Arg Ser Leu His Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn 225 230 235 240	841
cct aaa cac tgt cat cct tct tcc aga aaa agg agg gcg gcc atc tct Pro Lys His Cys His Pro Ser Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Ser 245 250 255	889
gtc ccc aag ggt ttc tgt agg aac ttc tgc cac cgt cat cag ctg ttc Val Pro Lys Gly Phe Cys Arg Asn Phe Cys His Arg His Gln Leu Phe 260 265 270	937
atc aac ttc cag gac ctg ggt tgg cac aag tgg gtc atc gcc cct aag Ile Asn Phe Gln Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Val Ile Ala Pro Lys 275 280 285	985
ggg ttc atg gca aat tac tgt cat gga gag tgc ccc ttc tca atg acc Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Met Thr 290 295 300	1033
acg tat tta aat agt tcc aat tat gct ttc atg cag gct ctg atg cat Thr Tyr Leu Asn Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His 305 310 315 320	1081
atg gct gac ccc aag gtc ccc aag gct gtc tgt gtc ccc acc aag ctc Met Ala Asp Pro Lys Val Pro Lys Ala Val Cys Val Pro Thr Lys Leu 325 330 335	1129
tcg ccc atc tcc atg ctc tat cag gat agt gat aag aac gtc att ctc Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Ser Asp Lys Asn Val Ile Leu 340 345 350	1177
cga cat tat gaa gac atg gta gtc gat gag tgt ggg tgt ggg Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly 355 360 365	1219
tagtctcgaa actaggcttag gagtgtgctt aggtaataactttaataaaa actaccaccc	1279
c	1280

<211> 366

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Met	Gln	Pro	Tyr	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Thr
1															15

Leu	Pro	Trp	Gly	Gln	Thr	Ser	Glu	Phe	Gln	Asp	Ser	Asp	Leu	Leu	Gln
															30
20															

Phe	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Ala	Pro	Ser	Pro	His	Arg	Phe	Gln	Pro	Val
															45
35															

Pro	Arg	Val	Leu	Arg	Lys	Ile	Ile	Arg	Ala	Arg	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala
															60
50															

Ser	Gly	Ala	Ser	Gln	Asp	Leu	Cys	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Gly	Val	Arg
															80
65															

Gly	Asn	Leu	Leu	Gln	Leu	Leu	Pro	Asp	Gln	Gly	Phe	Phe	Leu	Asn	Thr
															95
85															

Gln	Lys	Pro	Phe	Gln	Asp	Gly	Ser	Cys	Leu	Gln	Lys	Val	Leu	Tyr	Phe
															110
100															

Asn	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Glu	Lys	Ala	Lys	Leu	Thr	Met	Ala	Gln	Leu
															125
115															

Thr	Leu	Asp	Leu	Gly	Pro	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Asn	Leu	Arg	Pro	Glu	Leu
															140
130															

Val	Val	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Gln	Asp	Arg	Gly	Val	Trp	Gly	Arg	Ser
															160
145															

His	Pro	Lys	Val	Gly	Arg	Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	Pro
															175
165															

Gln	Gly	Gln	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Gln	Gly	Ala	Leu	Lys	Asp	Trp	Ser
															190
180															

Ser	Asn	Arg	Leu	Lys	Asn	Leu	Asp	Leu	His	Leu	Glu	Ile	Leu	Val	Lys
															205
195															

Glu	Asp	Arg	Tyr	Ser	Arg	Val	Thr	Val	Gln	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Asp
															220
210															

Pro	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	His	Ala	Ser	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Asn
															240
225															

Pro Lys His Cys His Pro Ser Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Ser
245 250 255

Val Pro Lys Gly Phe Cys Arg Asn Phe Cys His Arg His Gln Leu Phe
260 265 270

Ile Asn Phe Gln Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Val Ile Ala Pro Lys
275 280 285

Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Met Thr
290 295 300

Thr Tyr Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His
305 310 320

Met Ala Asp Pro Lys Val Pro Lys Ala Val Cys Val Pro Thr Lys Leu
325 330 335

Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Ser Asp Lys Asn Val Ile Leu
340 345 350

Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly
355 360 365

<210> 33

<211> 1224

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (37)..(1128)

<400> 33

ggagctctcc ccggcttgac agccactcca gaggcc atg ctt cgt ttc ttg cca 54
Met Leu Arg Phe Leu Pro
1 5

gat ttg gct ttc agc ttc ctg tta att ctg gct ttg ggc cag gca gtc 102
Asp Leu Ala Phe Ser Phe Leu Leu Ile Leu Ala Leu Gly Gln Ala Val
10 15 20

caa ttt caa gaa tat gtc ttt ctc caa ttt ctg ggc tta gat aag gcg 150
Gln Phe Gln Glu Tyr Val Phe Leu Gln Phe Leu Gly Leu Asp Lys Ala
25 30 35

cct tca ccc cag aag ttc caa cct gtg cct tat atc ttg aag aaa att 198
Pro Ser Pro Gln Lys Phe Gln Pro Val Pro Tyr Ile Leu Lys Ile

40	45	50	
ttc cag gat cgc gag gca gca gcg acc act ggg gtc tcc cga gac tta Phe Gln Asp Arg Glu Ala Ala Ala Thr Thr Gly Val Ser Arg Asp Leu	55	60	65 70 246
tgc tac gta aag gag ctg ggc gtc cgc ggg aat gta ctt cgc ttt ctc Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg Gly Asn Val Leu Arg Phe Leu	75	80	85 294
cca gac caa ggt ttc ttt ctt tac cca aag aaa att tcc caa gct tcc Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Tyr Pro Lys Lys Ile Ser Gln Ala Ser	90	95	100 342
tcc tgc ctg cag aag ctc ctc tac ttt aac ctg tct gcc atc aaa gaa Ser Cys Leu Gln Lys Leu Leu Tyr Phe Asn Leu Ser Ala Ile Lys Glu	105	110	115 390
agg gaa cag ttg aca ttg gcc cag ctg ggc ctg gac ttg ggg ccc aat Arg Glu Gln Leu Thr Leu Ala Gln Leu Gly Leu Asp Leu Gly Pro Asn	120	125	130 438
tct tac tat aac ctg gga cca gag ctg gaa ctg gct ctg ttc ctg gtt Ser Tyr Tyr Asn Leu Gly Pro Glu Leu Glu Leu Ala Leu Phe Leu Val	135	140	145 150 486
cag gag cct cat gtg tgg ggc cag acc acc cct aag cca ggt aaa atg Gln Glu Pro His Val Trp Gly Gln Thr Thr Pro Lys Pro Gly Lys Met	155	160	165 534
ttt gtg ttg cggt tca gtc cca tgg cca caa ggt gct gtt cac ttc aac Phe Val Leu Arg Ser Val Pro Trp Pro Gln Gly Ala Val His Phe Asn	170	175	180 582
ctg ctg gat gta gct aag gat tgg aat gac aac ccc cgg aaa aat ttc Leu Leu Asp Val Ala Lys Asp Trp Asn Asp Asn Pro Arg Lys Asn Phe	185	190	195 630
ggg tta ttc ctg gag ata ctg gtc aaa gaa gat aga gac tca ggg gtg Gly Leu Phe Leu Glu Ile Leu Val Lys Glu Asp Arg Asp Ser Gly Val	200	205	210 678
aat ttt cag cct gaa gac acc tgt gcc aga cta aga tgc tcc ctt cat Asn Phe Gln Pro Glu Asp Thr Cys Ala Arg Leu Arg Cys Ser Leu His	215	220	225 230 726
gct tcc ctg ctg gtg gtg act ctc aac cct gat cag tgc cac cct tct Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn Pro Asp Gln Cys His Pro Ser	235	240	245 774

cgg aaa agg aga gca gcc atc cct gtc ccc aag ctt tct tgt aag aac
 Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro Lys Leu Ser Cys Lys Asn
 250 255 260 822

ctc tgc cac cgt cac cag cta ttc att aac ttc cggt gac ctg ggt tgg
 Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn Phe Arg Asp Leu Gly Trp
 265 270 275 870

cac aag tgg atc att gcc ccc aag ggg ttc atg gca aat tac tgc cat
 His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His
 280 285 290 918

gga gag tgt ccc ttc tca ctg acc atc tct ctc aac agc tcc aat tat
 Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser Leu Asn Ser Ser Asn Tyr
 295 300 305 310 966

gct ttc atg caa gcc ctg atg cat gcc gtt gac cca gag atc ccc cag
 Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val Asp Pro Glu Ile Pro Gln
 315 320 325 1014

gct gtg tgt atc ccc acc aag ctg tct ccc att tcc atg ctc tac cag
 Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln
 330 335 340 1062

gac aat aat gac aat gtc att cta cga cat tat gaa gac atg gta gtc
 Asp Asn Asn Asp Asn Val Ile Leu Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val
 345 350 355 1110

gat gaa tgt ggg tgt ggg taggatgtca gaaatggaa tagaaggagt
 Asp Glu Cys Gly Cys Gly
 360 1158

gttcttaggg taaatctttt aataaaaacta cctatctgggt ttatgaccac ttagatcgaa 1218

atgtca 1224

<210> 34
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Met Leu Arg Phe Leu Pro Asp Leu Ala Phe Ser Phe Leu Leu Ile Leu
 1 . 5 10 15

Ala Leu Gly Gln Ala Val Gln Phe Gln Glu Tyr Val Phe Leu Gln Phe
 20 25 30

Leu Gly Leu Asp Lys Ala Pro Ser Pro Gln Lys Phe Gln Pro Val Pro

35	40	45
Tyr Ile Leu Lys Lys Ile Phe Gln Asp Arg Glu Ala Ala Ala Thr Thr		
50	55	60
Gly Val Ser Arg Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg Gly		
65	70	75
Asn Val Leu Arg Phe Leu Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Tyr Pro Lys		
85	90	95
Lys Ile Ser Gln Ala Ser Ser Cys Leu Gln Lys Leu Leu Tyr Phe Asn		
100	105	110
Leu Ser Ala Ile Lys Glu Arg Glu Gln Leu Thr Leu Ala Gln Leu Gly		
115	120	125
Leu Asp Leu Gly Pro Asn Ser Tyr Tyr Asn Leu Gly Pro Glu Leu Glu		
130	135	140
Leu Ala Leu Phe Leu Val Gln Glu Pro His Val Trp Gly Gln Thr Thr		
145	150	155
160		
Pro Lys Pro Gly Lys Met Phe Val Leu Arg Ser Val Pro Trp Pro Gln		
165	170	175
Gly Ala Val His Phe Asn Leu Leu Asp Val Ala Lys Asp Trp Asn Asp		
180	185	190
Asn Pro Arg Lys Asn Phe Gly Leu Phe Leu Glu Ile Leu Val Lys Glu		
195	200	205
Asp Arg Asp Ser Gly Val Asn Phe Gln Pro Glu Asp Thr Cys Ala Arg		
210	215	220
Leu Arg Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn Pro		
225	230	235
240		
Asp Gln Cys His Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro		
245	250	255
Lys Leu Ser Cys Lys Asn Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn		
260	265	270
Phe Arg Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Phe		
275	280	285
Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser		
290	295	300

Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val
 305 310 315 320

Asp Pro Glu Ile Pro Gln Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro
 325 330 335

Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Asn Asn Asn Val Ile Leu Arg His
 340 345 350

Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly
 355 360

<210> 35

<211> 1248

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (32)..(1003)

<400> 35

agtggatccc ccgggctgca ggaattccgg g	atg	gat	cct	cga	acc	tgg	cta	52
	Met	Asp	Pro	Arg	Thr	Trp	Leu	
	1					5		

agc ttc caa ggg cct cca ggt ggg cct gga atc gga cca ggc tca gag	100
Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly Pro Gly Ser Glu	
10 15 20	

gta ttg ggg atc tcc cca tgt ccg ccc gca tac gag ttc tgc gga ggg	148
Val Leu Gly Ile Ser Pro Cys Pro Pro Ala Tyr Glu Phe Cys Gly Gly	
25 30 35	

atg gca tac tgt gga cct cag gtt ggt ctg ggc cta gtc ccc caa gtt	196
Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly Leu Gly Leu Val Pro Gln Val	
40 45 50 55	

ggc gtg gag act ttg cag cct gag ggc cag gca gga gca cga gtg gaa	244
Gly Val Glu Thr Leu Gln Pro Glu Gly Gln Ala Gly Ala Arg Val Glu	
60 65 70	

agc aac tca gag gga acc tcc tct gag ccc tgt gcc gac cgc ccc aat	292
Ser Asn Ser Glu Gly Thr Ser Ser Glu Pro Cys Ala Asp Arg Pro Asn	
75 80 85	

gcc gtg aag ttg gag aag gtg gaa cca act ccc gag gag tcc cag gac	340
Ala Val Lys Leu Glu Lys Val Glu Pro Thr Pro Glu Glu Ser Gln Asp	

90	95	100	
atg aaa gcc ctg cag aag gag cta gaa cag ttt gcc aag ctg ctg aag Met Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys 105	110	115	388
cag aag agg atc acc ttg ggg tac acc cag gcc gac gtg ggg ctc acc Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr 120	125	130	436
ctg ggc gtt ctc ttt gga aag gtg ttc agc cag acc acc atc tgt cgc Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg 140	145	150	484
ttc gag gcc ttg cag ctc agc ctt aag aac atg tgt aag ctg cgg ccc Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Leu Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro 155	160	165	532
ctg ctg gag aag tgg gtg gag gaa gcc gac aac aat gag aac ctt cag Leu Leu Glu Lys Trp Val Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln 170	175	180	580
gag ata tgc aaa tcg gag acc ctg gtg cag gcc cggt aag aga aag cga Glu Ile Cys Lys Ser Glu Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg 185	190	195	628
act agc att gag aac cgt gtg agg tgg agt ctg gag acc atg ttt ctg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Trp Ser Leu Glu Thr Met Phe Leu 200	205	210	676
aag tgc ccg aag ccc tcc cta cag cag atc act cac atc gcc aat cag Lys Cys Pro Lys Pro Ser Leu Gln Gln Ile Thr His Ile Ala Asn Gln 220	225	230	724
ctt ggg cta gag aag gat gtg gtt cga gta tgg ttc tgt aac cgg cgc Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg 235	240	245	772
cag aag ggc aaa aga tca agt att gag tat tcc caa cga gaa gag tat Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ile Glu Tyr Ser Gln Arg Glu Glu Tyr 250	255	260	820
gag gct aca ggg aca cct ttc cca ggg ggg gct gta tcc ttt cct ctg Glu Ala Thr Gly Thr Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val Ser Phe Pro Leu 265	270	275	868
ccc cca ggt ccc cac ttt ggc acc cca ggc tat gga agc ccc cac ttc Pro Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe 280	285	290	916
295			

acc aca ctc tac tca gtc cct ttt cct gag ggc gag gcc ttt ccc tct		964
Thr Thr Leu Tyr Ser Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Ser		
300	305	310
gtt ccc gtc act gct ctg ggc tct ccc atg cat tca aac tgaggcacca		1013
Val Pro Val Thr Ala Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn		
315	320	
gccctccctg gggatgctgt gagccaaggc aaggaggtta gacaagagaa cctggagctt	1073	
tgggttaaa ttctttact gaggagggat taaaagcaca acaggggtgg ggggtggat	1133	
ggggaaagaa gctcagtgtat gctgttgatc aggagcctgg cctgtctgtc actcatcatt	1193	
ttgttcttaa ataaagactg ggacacacag taaaaaaaaa aaaaaaaaaac tcgag	1248	

<210> 36
<211> 324
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 36			
Met Asp Pro Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro			
1	5	10	15
Gly Ile Gly Pro Gly Ser Glu Val Leu Gly Ile Ser Pro Cys Pro Pro			
20	25	30	
Ala Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly			
35	40	45	
Leu Gly Leu Val Pro Gln Val Gly Val Glu Thr Leu Gln Pro Glu Gly			
50	55	60	
Gln Ala Gly Ala Arg Val Glu Ser Asn Ser Glu Gly Thr Ser Ser Glu			
65	70	75	80
Pro Cys Ala Asp Arg Pro Asn Ala Val Lys Leu Glu Lys Val Glu Pro			
85	90	95	
Thr Pro Glu Glu Ser Gln Asp Met Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu			
100	105	110	
Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr			
115	120	125	
Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe			
130	135	140	

Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Leu Lys
 145 150 155 160

Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Glu Lys Trp Val Glu Glu Ala
 165 170 175

Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ser Glu Thr Leu Val
 180 185 190

Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Trp
 195 200 205

Ser Leu Glu Thr Met Phe Leu Lys Cys Pro Lys Pro Ser Leu Gln Gln
 210 215 220

Ile Thr His Ile Ala Asn Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg
 225 230 235 240

Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ile Glu
 245 250 255

Tyr Ser Gln Arg Glu Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Thr Pro Phe Pro Gly
 260 265 270

Gly Ala Val Ser Phe Pro Leu Pro Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro
 275 280 285

Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Thr Leu Tyr Ser Val Pro Phe Pro
 290 295 300

Glu Gly Glu Ala Phe Pro Ser Val Pro Val Thr Ala Leu Gly Ser Pro
 305 310 315 320

Met His Ser Asn

<210> 37

<211> 1371

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(1122)

<400> 37

ctcatttcac caggccccc gcttggggcg ctttccttcc cc atg gcg gga cac 54
 Met Ala Gly His

出証特2005-3026886

ctg gct tcg gat ttc gcc ttc tcg ccc cct cca ggt ggt gga ggt gat Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly Gly Gly Gly Asp	5 10 15 20	102
ggg cca ggg ggg ccg gag ccg ggc tgg gtt gat cct cggt acc tgg cta Gly Pro Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro Arg Thr Trp Leu	25 30 35	150
agc ttc caa ggc cct cct gga ggg cca gga atc ggg ccg ggg gtt ggg Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Pro Gly Ile Gly Pro Gly Val Gly	40 45 50	198
cca ggc tct gag gtg tgg ggg att ccc cca tgc ccc ccg ccg tat gag Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro Pro Pro Tyr Glu	55 60 65	246
ttc tgt ggg ggg atg gcg tac tgt ggg ccc cag gtt gga gtg ggg cta Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly Val Gly Leu	70 75 80	294
gtg ccc caa ggc ggc ttg gag acc tct cag cct gag ggc gaa gca gga Val Pro Gln Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu Gly Glu Ala Gly	85 90 95 100	342
gtc ggg gtg gag agc aac tcc gat ggg gcc tcc ccg gag ccc tgc acc Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro Glu Pro Cys Thr	105 110 115	390
gtc acc cct ggt gcc gtg aag ctg gag aag gag aag ctg gag caa aac Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys Leu Glu Gln Asn	120 125 130	438
ccg gag gag tcc cag gac atc aaa gct ctg cag aaa gaa ctc gag caa Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu Gln	135 140 145	486
ttt gcc aag ctc ctg aag cag aag agg atc acc ctg gga tat aca cag Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr Gln	150 155 160	534
gcc gat gtg ggg ctc acc ctg ggg gtt cta ttt ggg aag gta ttc agc Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe Ser	165 170 175 180	582
caa acg acc atc tgc cgc ttt gag gct ctg cag ctt agc ttc aag aac Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Phe Lys Asn	185 190 195	630

atg tgt aag ctg cgg ccc ttg ctg cag aag tgg gtg gag gaa gct gac Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val Glu Glu Ala Asp	200	205	210	678	
aac aat gaa aat ctt cag gag ata tgc aaa gca gaa acc ctc gtg cag Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu Thr Leu Val Gln	215	220	225	726	
gcc cga aag aga aag cga acc agt atc gag aac cga gtg aga ggc aac Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Gly Asn	230	235	240	774	
ctg gag aat ttg ttc ctg cag tgc ccg aaa ccc aca ctg cag cag atc Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gln Ile	245	250	255	260	822
agc cac atc gcc cag cag ctt ggg ctc gag aag gat gtg gtc cga gtg Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg Val	265	270	275	870	
tgg ttc tgt aac cgg cgc cag aag ggc aag cga tca agc agc gac tat Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ser Asp Tyr	280	285	290	918	
gca caa cga gag gat ttt gag gct gct ggg tct cct ttc tca ggg gga Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro Phe Ser Gly Gly	295	300	305	966	
cca gtg tcc ttt cct ctg gcc cca ggg ccc cat ttt ggt acc cca ggc Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro Gly	310	315	320	1014	
tat ggg agc cct cac ttc act gca ctg tac tcc tcg gtc cct ttc cct Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser Val Pro Phe Pro	325	330	335	340	1062
gag ggg gaa gcc ttt ccc cct gtc tct gtc acc act ctg ggc tct ccc Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr Leu Gly Ser Pro	345	350	355	1110	
atg cat tca aac tgaggtgcct gcccttctag gaatggggga cagggggagg Met His Ser Asn	360			1162	
ggaggagcta gggaaagaaa acctggagtt tgtgccaggg tttttggatt aagttcttca				1222	
ttcactaagg aaggaattgg gaacacaaag ggtggggca gggagttg gggcaactgg				1282	
ttggagggaa ggtgaagttc aatgatgctc ttgatttaa tcccacatca tgtatcactt				1342	

ttttcttaaa taaagaagct tgggacaca 1371

<210> 38

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Asp Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro
20 25 30

Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly
35 40 45

Pro Gly Val Gly Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro
50 55 60

Pro Pro Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val
65 70 75 80

Gly Val Gly Leu Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu
85 90 95

Gly Glu Ala Gly Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro
100 105 110

Glu Pro Cys Thr Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys
115 120 125

Leu Glu Gln Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys
130 135 140

Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu
145 150 155 160

Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly
165 170 175

Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu
180 185 190

Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val
195 200 205

Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu
210 215 220

Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg
 225 230 235 240
 Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr
 245 250 255
 Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp
 260 265 270
 Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser
 275 280 285
 Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro
 290 295 300
 Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe
 305 310 315 320
 Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser
 325 330 335
 Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr
 340 345 350
 Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn
 355 360

<210> 39
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 39
 aggtctgct actgagatgc tctg

24

<210> 40
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 40
aggcagggtct tcagaggaag ggcg 24

<210> 41
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 41
cgggctgttag acctgtctgc attctg 26

<210> 42
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 42
ggtccttctg tctcatcctc gagagt 26

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 43
accaaggtaa ccgcatccaa 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 44
cttcaccaag atttccgatg 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 45 20
gaatgggtgga ctagctttg

<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 46 22
tgccatgaat gtcgatatgc ag

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 47 26
ccgcggaaag tcaagagatt gggtgg

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 48 30
gcggccgcct ttacgggtca cgagggtcac

<210> 49
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 49
tgtggccagt gtttggttct ggcggg

26

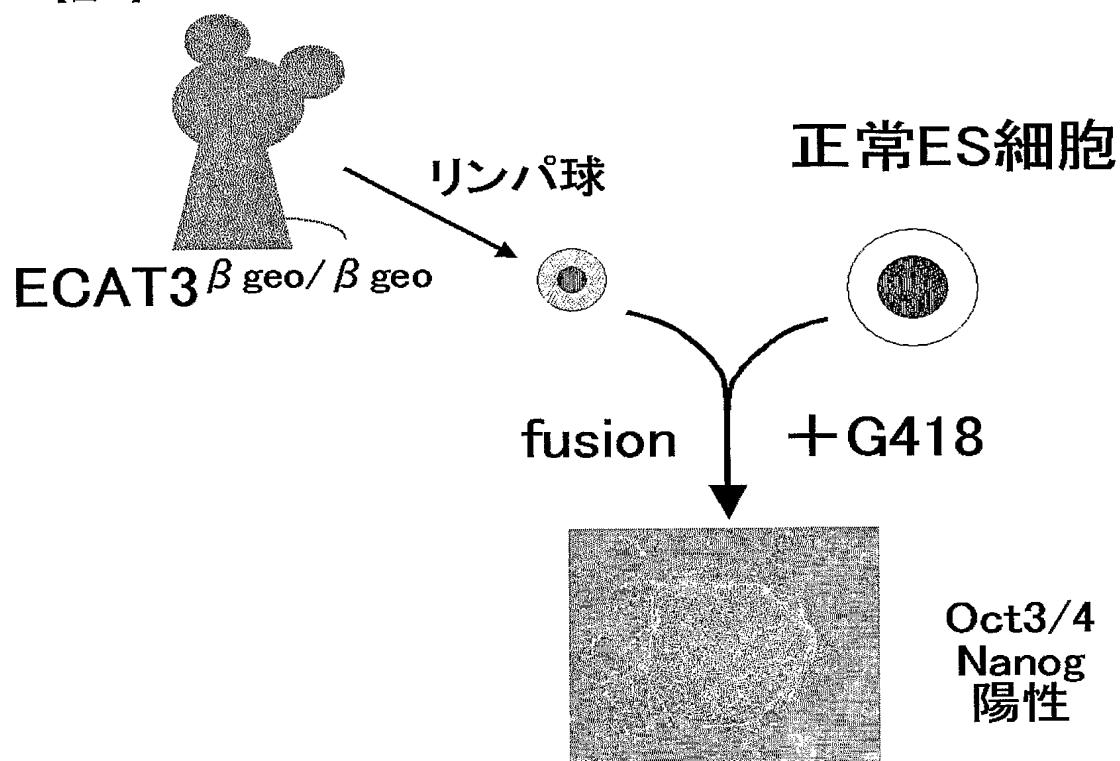
<210> 50
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

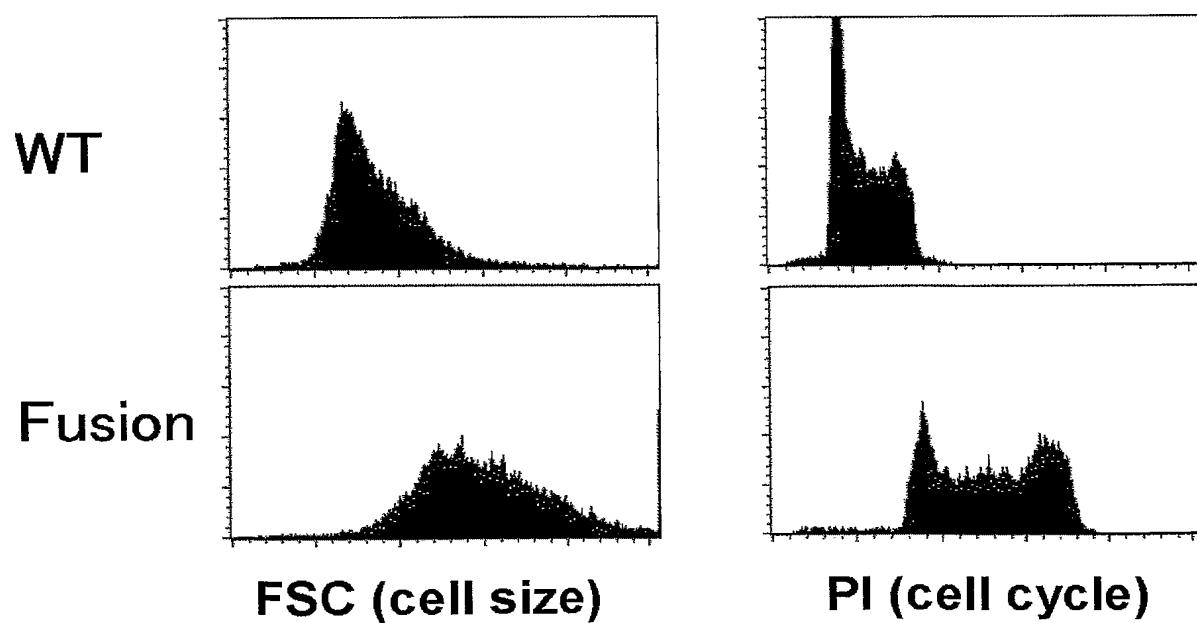
<400> 50
ctcgaggact cgccattcta gccaaag

26

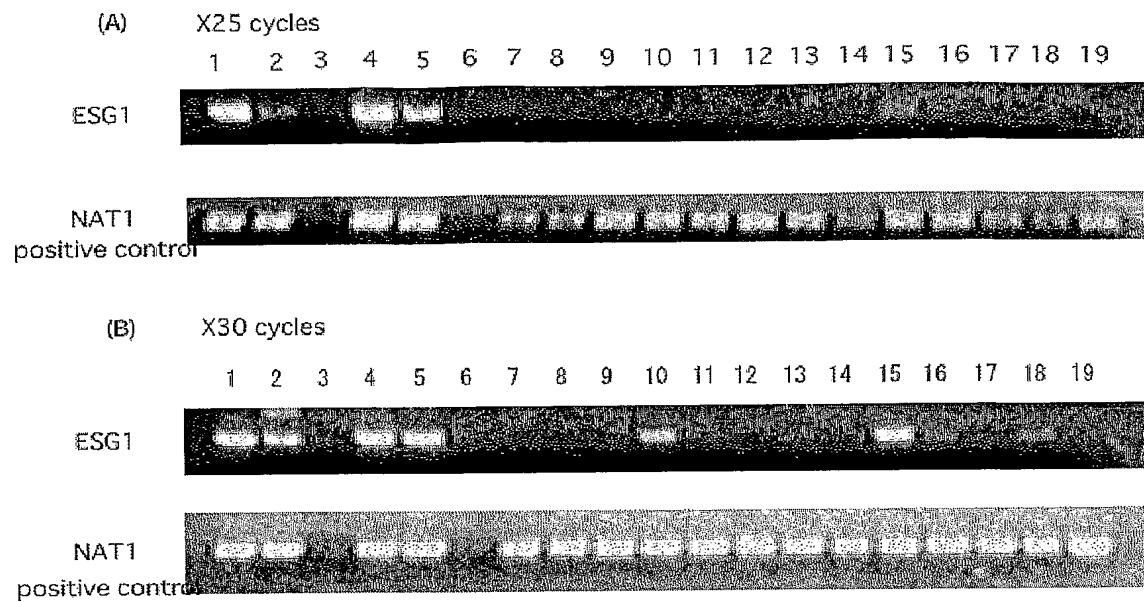
【書類名】 図面
【図 1】



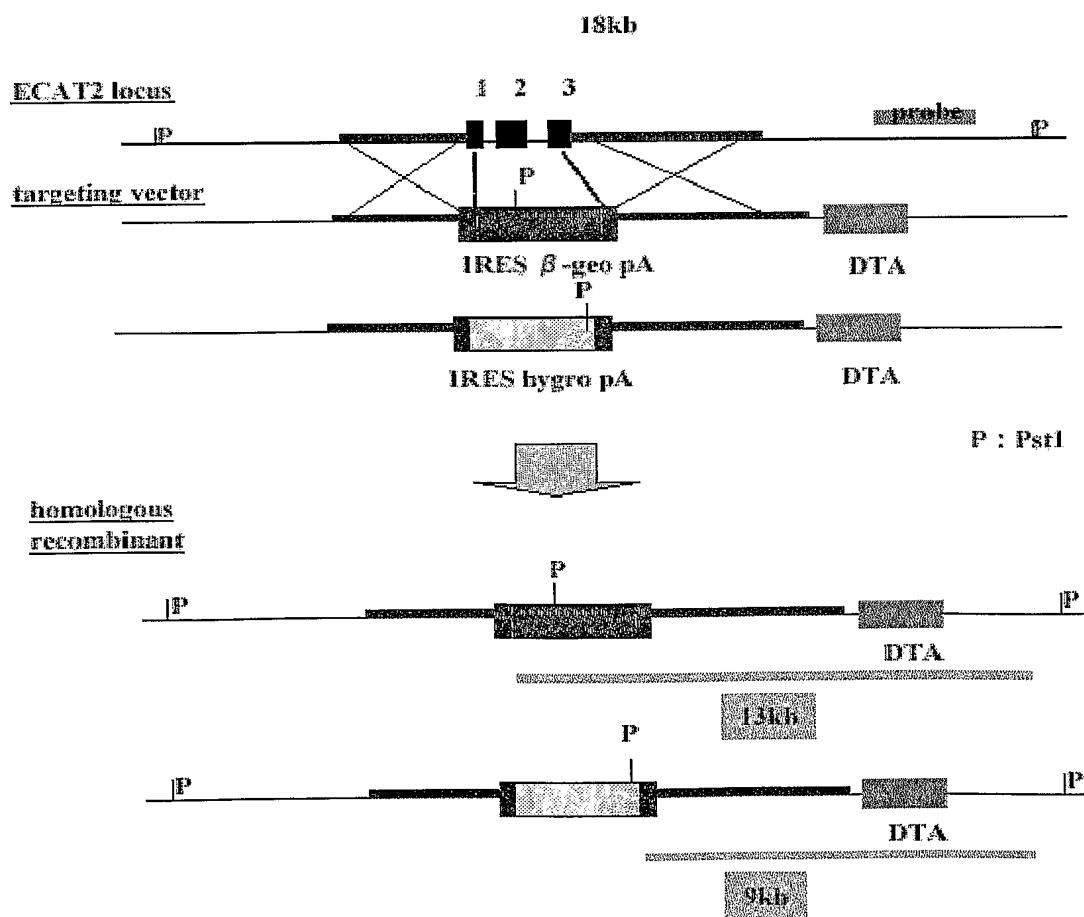
【図 2】



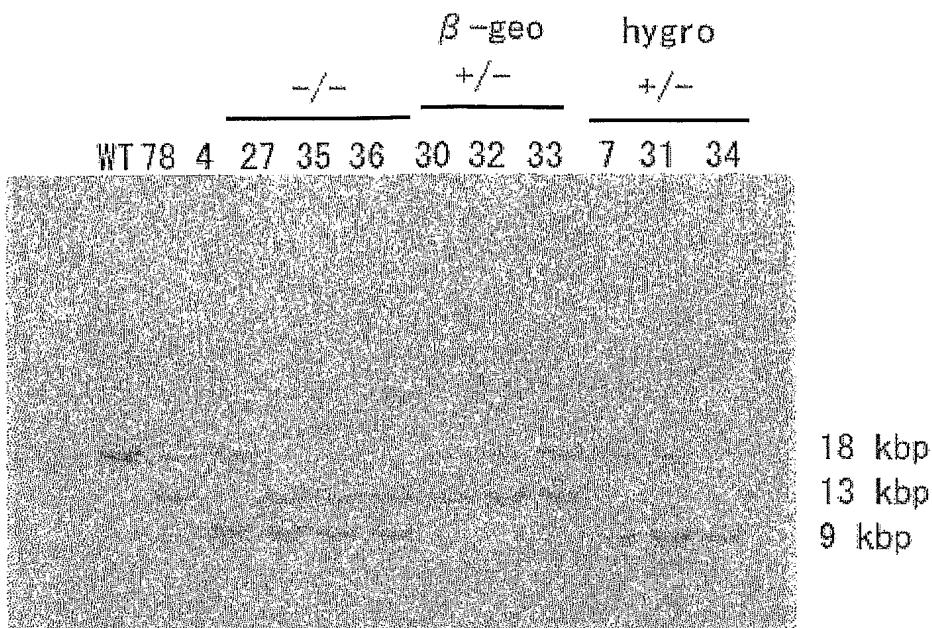
【図 3】



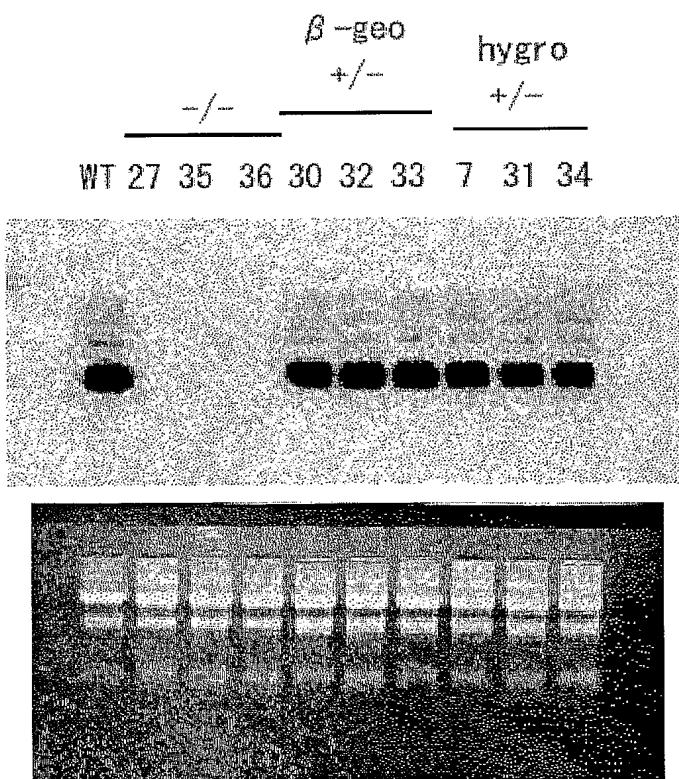
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 体細胞核初期化物質の新規なスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 (a) E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、および (b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法等。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-232961
受付番号	50401348130
書類名	特許願
担当官	笹川 友子 9482
作成日	平成16年 9月10日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成16年 8月10日
-------	-------------

特願 2004-232961

出願人履歴情報

識別番号

[501219312]

1. 変更年月日 2001年 5月31日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市天王寺区堂ヶ芝2-9-7-1401

氏 名 山中 伸弥

特願 2004-232961

出願人履歴情報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
氏名 住友製薬株式会社